Série A, N° 3846
N° d'Ordre
4697

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Pierre RIVAILLE

PREMIÈRE THÈSE

La transestérification des phényl-phosphates cycliques de glycosides en milieu alcalin

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

Soutenues le 2 AVR 1962 devant la Commission d'examen

M^lle^ LE BRETON *Président*

MM. LEDERER, JULIA M. *Examinateurs*

Série A, N° 3846
N° d'Ordre
4697

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Pierre RIVAILLE

PREMIÈRE THÈSE

La transestérification des phényl-phosphates cycliques de glycosides en milieu alcalin

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

Soutenues le devant la Commission d'examen

M^lle^ LE BRETON *Président*

MM. LEDERER, JULIA M. *Examinateurs*

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

(Janvier 1962)

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

PROFESSEURS

DOYEN ..... M. ZAMANSKY

G. JULIA	T	Anaylse supérieure et Algèbre supér.
DE BROGLIE	T	Théories physiques
PRENANT	T	Anatomie et Histologie comparées
PERES	T	Mécanique des fluides et applications
GRASSE	T	Evolution des êtres organisés
PREVOST	T	Chimie organique
CHAUDRON	T	Chimie appliquée
WYART	T	Minéralogie et Cristallographie
TEISSIER	T	Zoologie
MANGENOT	T	Biologie Végétale (ORSAY)
AUGER	T	Physique quantique et Relativité
MONNIER	T	Physiologie générale
PIVETEAU	T	Paléontologie
ROCARD	T	Physique (E.N.S.)
CARTAN	T	Mathématiques (E.N.S.)
LAFFITTE	T	Chimie générale
FAVARD	T	Géométrie supérieure
COULOMB	T	Physique du Globe
Mlle COUSIN	T	Biologie Animale (S.P.C.N.)
CHRETIEN	T	Chimie minérale
DRACH	T	Zoologie
KASTLER	T	Physique (E.N.S.)
EPHRUSSI	T	Génétique
RIVIERE	T	Géologie S.P.C.N. et sédim.
GAUTHERET	T	Biologie Végétale (P.C.B.)
LUCAS R.	T	Recherches physiques
THOMAS A.	T	Biologie cellulaire
ARNULF	T	Optique appliquée
MORAND	T	Physique Enseignement
SOLEILLET	T	Physique (P.C.B.)
FORTIER	T	Mécanique expérimentale des Fluides
DANJON	T	Astronomie
PETIT	T	Biologie maritime
QUENEY	T	Météorologie et dynamique atmosphér.
GALLIEN	T	Embryologie
EICHHORN	T	Botanique
DE CUGNAC	T	Biologie végétale (S.P.C.N.)
Mlle CAUCHOIS	T	Chimie Physique
THELLIER	T	Physique du Globe
L'HERITIER	T	Biologie générale (ORSAY)
GRIVET	T	Radioélectricité (ORSAY)
PONCIN	T	Mécanique générale
DUBREIL	T	Arithmétique et théorie des Nombres
QUELET	T	Chimie organique
CAGNIARD	T	Géophysique appliquée
CHAMPETIER	T	Chimie macromoléculaire
CUVILLIER	T	Micropaléontologie
JUNG	T	Pétrographie
TRILLAT	T	Microscopie et diffraction électronique
WIEMANN	T	Chimie organique et struct.
JACQUINOT	T	Spectroscopie et Phys. céleste (ORSAY)
VASSY	T	Physique de l'Atmosphère
DESTOUCHES	T	Théories physiques
AMIEL	T	Chimie générale
HOCART	T	Minéralogie et Cristallographie
J.-P. MATHIEU	T	Physique (Optique)
COUTEAUX	T	Biologie animale (P.C.B.).
MAY	T	Zoologie (ORSAY)
CHOQUET	T	Théorie des fonctions et Topologie
FELDMANN	T	Biologie végétale marine
GUINIER	T	Physique des Solides (ORSAY)
JOST	T	Physiologie comparée
FORTET	T	Calcul des Probabilités et Phys. math
SCHWARTZ	T	Calcul différentiel et intégral
CHOUARD	T	Physiologie végétale
MALAVARD	T	Aviation (Techn. aéronaut.)
BRELOT	T	Calcul différentiel et intégral
NORMANT	T	Synthèse organique générale
BENARD	T	Chimie minérale
BUVAT	T	Botanique (E.N.S.)
DUGUE	T	Statistiques mathématiques
SOULAIRAC	T	Psychophysiologie
ULRICH	T	Physiologie végétale
MARECHAL	T	Optique théorique et appliquée
KIRRMANN	T	Théories chimiques
CHADEFAUD	T	Botanique
Mlle LE BRETON	T	Physiologie de la nutrition
SALEM	T	Mathématiques générales
LELONG	T	Application de l'analyse à la géométrie
DEVILLERS	T	Anatomie et Histologie comparées
EHRESMANN	T	Topologie algébrique
FRANÇON	T	Physique (S.P.C.N.)
GLANGEAUD	T	Géographie phys. et Géologie dynam.
GODEMENT	T	Mathématiques (M.P.C.)
PISOT	T	Technique mathématique de la Physique
ROCH	T	Géologie
SCHATZMAN	T	Astrophysique
TERMIER	T	Paléontologie stratigraphique
ZAMANSKY	T	Mathématiques générales
LENNUIER	T	Physique (M.G.P.)
RIZET	T	Génétique (ORSAY)
ROUTHIER	T	Géologie appliquée
Mme TONNELAT	T	Physique théorique
DIXMIER	T	Mathématiques (M.P.C.)
SOUCHAY	T	Chimie générale
AIGRAIN	T	Electrotechnique générale
BRUSSET	T	Chimie systématique
M. LEVY	T	Physique théorique des hautes énergies (ORSAY)
Mme CHAIX	T	Chimie biologique

Mme HUREL-PY		Biologie végétale (P.C.B.)
PIAUX	T	Chimie (M.P.C.)
BRUN	T	Mécanique théorique des Fluides
LEDERER	T	Chimie biologique
Mme DUBREIL	T	Mathématique (Agrégation)
Mme LELONG	T	Mathématiques (E.N.S.)
BELLAIR	T	Géologie (S.P.C.N.)
COTTE	T	Physique électricité
DUBOIS J.-E.	T	Chimie organique
LAMOTTE	T	Zoologie (E.N.S.)
MICHEL A.	T	Chimie minérale (ORSAY)
OLMER	T	Energétique générale
ROUAULT	T	Electricité (ORSAY)
GAUTHIER	T	Mécanique appliquée
BARCHEWITZ	T	Chimie physique
BROSSEL	T	Physique atomique
BUSER		Physiologie comparée
CAMUS		Physiologie végétale B.M.P.V.
CASTAING	T	Physique (ORSAY)
CURIEN	T	Minéralogie et Cristallographie
MOYSE	T	Physiologie végétale (ORSAY)
NOIROT		Evolution des êtres organiques
FANNETIER	T	Chimie générale (ORSAY)
POSSOMPES	T	Zoologie
PULLMANN	T	Chimie théorique
TEILLAC	T	Physique nucléaire et Radioactivité
TONNELAT	T	Biologie physico-chimique
VILLE	T	Econométrie
WILLEMART		Chimie (P.C.B.
DODE	T	Chimie (ORSAY)
FREYMANN	T	Recherches physiques
GUINOCHET	T	Biologie végétale S.P.C.N. (ORSAY)
ROLLET	T	Chimie (P.C.B.)
Mlle JOSIEN	T	Chimie S.P.C.N.
CHEVALLEY	T	Géométrie algébrique et Théorie des Groupes
ARNOULT	T	Electronique (ORSAY)
CHAPELLE	T	Physique (ORSAY)
DELANGE	T	Mathématiques (ORSAY)
DENY	T	Mathématiques générales (ORSAY)
GERMAIN	T	Mécanique théorique des Fluides
LUCAS G.	T	Géologie
ALLARD	T	Chimie physique
BERTHELOT	T	Physique fondamentale des Hautes Energies (ORSAY)
BRICART	T	Météorologie et Physique de l'Atmosph.
Mme ALBE-FESSARD		Psychophysiologie
FRIEDEL		Physique des Solides (ORSAY)
M. JULIA		Etudes des Moléculaires naturelles complexes
LENDER	T	Biol. animale (S.P.C.N.) (ORSAY)
MAGAT		Physico-chimie des Radio-Eléments
Mlle QUINTIN	T	Electrochimie
MONOD	T	Chimie du métabolisme
BENOIT	T	Physiologie animale (ORSAY)
DE POSSEL	T	Analyse numérique
CHARLOT	T	Chimie analytique
HAISSINSKY	T	Radiochimie
LEMEE	T	Physiologie végét. (B.M.P.V.) (ORSAY)
GUERIN	T	Chimie (M.P.C.) (ORSAY)
CHATELET M.		Chimie (P.C.B.)
JEAN	T	Physique nucléaire (ORSAY)
MATTLER	T	Physique (S.P.C.N.) (ORSAY)
MICHEL L.		Physique théorique des Hautes Energies (ORSAY)
BERGERARD		Zoologie (ORSAY)
BERTEIN		Electronique (ORSAY)
BOUISSIERES		Chimie des Radioéléments (ORSAY)
Mme COUTURE		Thermodynamique et Mécan. physique
ELLENBERGER		Géologie appl. sur le terr.
FRANC		Biologie animale (P.C.B.)
SCHNELL		Botanique tropicale (ORSAY)
STOLKOWSKI		Physiologie générale
ACHER		Chimie biologique (ORSAY)
BAUDOIN		Biologie animale (P.C.B.)
BEAUMONT		Biologie animale (S.P.C.N.)
BLAMONT		Géophysique Ionosphère
BOURREAU		Botanique
CURIE D.		Physique (M.G.P.)
DURAND-DELGA		Géologie
FREON	T	Chimie organique (ORSAY)
HELLER		Physiologie végétale
TORTRAT		Calcul des Probabilités
CAILLEUX		Géologie (S.P.C.N.)
MAGNAN	T	Physique (S.P.C.N.)
DAUDEL	T	Mécanique ondulatoire appliquée à la Chimie théor. et à la Phys. nucléaire
Mlle FOURCROY		Biologie végétale (S.P.C.N.)
Mme CHOQUET-BRUHAT	T	Méc. analytique et Méc. céleste
Mlle VEIL		Physiologie générale
LWOFF	T	Microbiologie
SIESTRUNCK	T	Mécan. physique et expérimentale.
LACOMBE	T	Métallurgie des métaux nucléaires
BROCHARD	T	Physique (P.C.B.) (ORSAY)
CABANNES	T	Mécanique générale
LESIEUR	T	Mathématiques (M.P.C.) (ORSAY)
MAZET	T	Mécanique générale (ORSAY)
CAIRE		Géographie physique et Géologie dyn.
COMOLET		Mécanique des Fluides
CORABŒUF		Physiologie animale
DELLOUE		Physique de l'Exosphère
GORENFLOT		Botanique II (ORSAY)
HOUILLON		Biologie animale (P.C.B.)
JULLIEN J.		Chimie (P.C.B.)
MALGRANGE		Technique mathématique de la Phys.
OLIVIER		Anthropologie
NOZERAN	T	Botanique II (ORSAY)
BLANC-LAPIERRE		Physique (E.N.S.) (ORSAY)

SECRETAIRE GENERAL ..... R. POULLAIN

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549211_0022

Ce travail a été effectué au Centre de Recherches Physiologiques sur la Cellule Normale et Cancéreuse sous la direction de Mademoiselle LE BRETON, Professeur à la Falculté des Sciences . Nous tenons à lui exprimer ici toute notre reconnaissance pour la sollicitude avec laquelle elle a suivi nos recherches et pour l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant de présider la Commission d'Examen.

Monsieur le Professeur LEDERER a bien voulu être le rapporteur de cette thèse. Qu'il trouve ici l'expression de notre profonde gratitude.

Monsieur le Professeur JULIA dont nous avons été l'étudiant, a accepté de faire partie de la Commission d'Exam n. Nous voulons lui témoigner notre profonde reconnaissance et l'excellent souvenir que nous gardons de son enseignement.

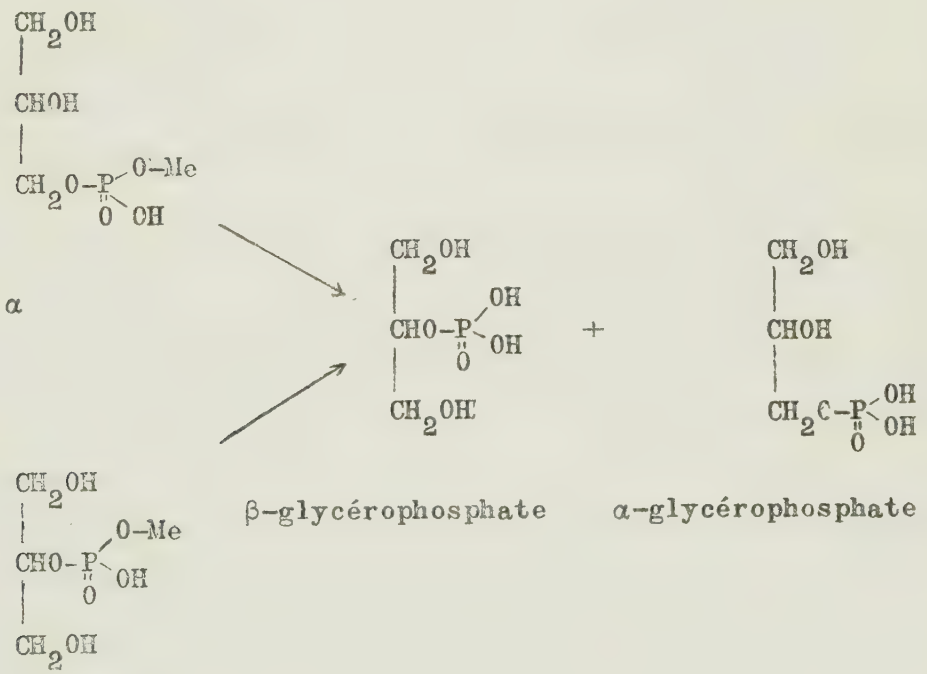
Monsieur SZABÓ, Maître de Recherches, a dirigé inlassablement ce travail. Il n'a cessé de nous prodiguer des conseils éclairés et des encouragements grâce auxquels il nous a été possible de mener à bien ces recherches. Nous sommes heureux de pouvoir l'en remercier maintenant.

Que tous ceux et celles qui, par leur aide et leur bienveillance, nous ont permis de réaliser cet ouvrage, trouvent ici l'expression de notre vive reconnaissance et de notre profonde gratitude.

INTRODUCTION

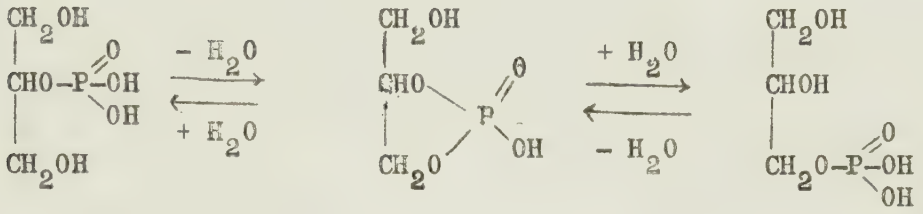
Depuis plusieurs années déjà, biochimistes et chimistes se sont penchés sur l'étude des esters de l'acide phosphorique, les uns pour élucider leur rôle comme métabolites intermédiaires, les autres pour déterminer leur structure et étudier leurs réactions.

Dès 1935, BAILLY et GAUMÉ (1) ont établi que l'hydrolyse alcaline des méthyl glycérophosphates α et β donnait un mélange de glycérophosphates α et β sans formation de méthyl phosphate.



Par la suite BAILLY (2) s'est aperçue qu'en milieu acide les formes α et β de l'acide glycérophosphorique s'isomérisaient.

VERKADE (3) formula l'hypothèse que cette isomérisation se produisait par l'intermédiaire d'une cylisation, et CHARGAFF (4) utilisant du phosphore marqué la confirma, et démontra que ce réarrangement était intramoléculaire.



En 1948, BAER et KATES (5,6) concluaient à la suite de leurs travaux, que la migration du groupe phosphate dans la molécule de méthylglycérophosphate venant du catabolisme des céphalines du cerveau et des lécithines, s'opérait par l'intermédiaire d'un phosphate cyclique.

Déjà en 1942, FONO (7) avait entrevu l'importance des groupes hydroxyles voisins du phosphate sur l'instabilité des diesters phosphoriques et il avançait l'hypothèse de la formation d'un cycle intermédiaire sur ces hydroxyles pendant les réactions d'hydrolyse des esters phosphoriques.

CARTER et COHN (8), après avoir hydrolysé l'acide ribonucléique de leveure ont séparé deux acides adényliques isomères a et b et par la suite, les trois autres nucléotides ont été séparés par paires d'isomères (9 à 13). CARTER (14) a suggéré alors que l'acide adénylique a était l'adénosine 2 phosphate et le b l'adénosine 3 phosphate.

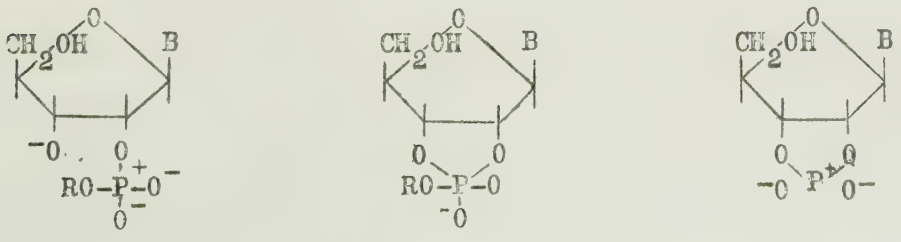
BROWN et TODD (15) ont démontré que ces deux isomères restaient stables en milieu alcalin, mais étaient interconvertibles en

milieu acide. Ils ont postulé que cette conversion s'effectuait par l'intermédiaire d'un cycle (16) et proposé alors pour un mécanisme précis de l'hydrolyse du méthyl glycérophosphate observée précédemment le passage par la forme d'un triester neutre.

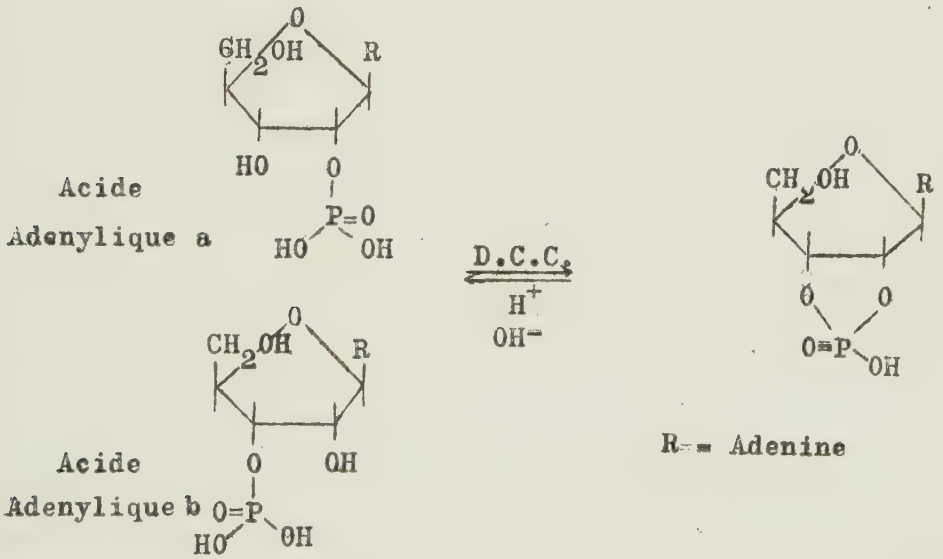
Des travaux effectués dès 1922 (17 à 22) avaient montré que si les acides ribonucléiques étaient dégradés par des bases en mononucléotides, les acides désoxyribonucléiques où le constituant glucidique ne possède pas deux groupes hydroxyles voisins restaient stables en milieu alcalin (17). L'ensemble de ces recherches ont permis à TODD et à ses collaborateurs (23) d'appliquer la théorie de cyclisation intermédiaire dans la dégradation alcaline des polynucléotides. La liaison phosphorique entre les chaînes de nucléosides serait scindée entre l'hydroxyle en 5 et le phosphate, puis il se produirait une cyclisation sur l'hydroxyle en 2 suivie d'une hydrolyse donnant naissance aux nucléosides-2-et-3-phosphate.

Cette theorie se trouva confirmée par les travaux de MARKHAM et SMITH (24,25) qui isolèrent les nucléosides 2,3 phosphate à partir de l'acide ribonucléique et les identifièrent à ceux synthétisés par BROWN, MARGRATH et TODD(23).

En 1954, LIPKIN (26,27) suivit le processus de l'hydrolyse alcaline des acides ribonucléiques, soit dans un milieu enrichi en ^{18}O, soit avec du méthoxyde de sodium et, à la suite des travaux de BLUMENTHAL et HERBERT (28) et de JORDAN (29) avança que le mécanisme de réaction s'effectuait par les étapes suivantes.



Ces hypothèses sur le passage par des cycles intermédiaires dans l'hydrolyse des acides ribonucléiques amenèrent d'autres chercheurs à étudier la formation de ces cycles phosphorylés sur les nucléosides. En particulier DEKKER et KHORANA (30) en traitant les acides adényliques a et b par le dicyclohexycarbodiimide (DCC) avaient retrouvé de l'adénosine-2,3-phosphate cyclique qui par hydrolyse acide ou basique redonnait les produits de départ.

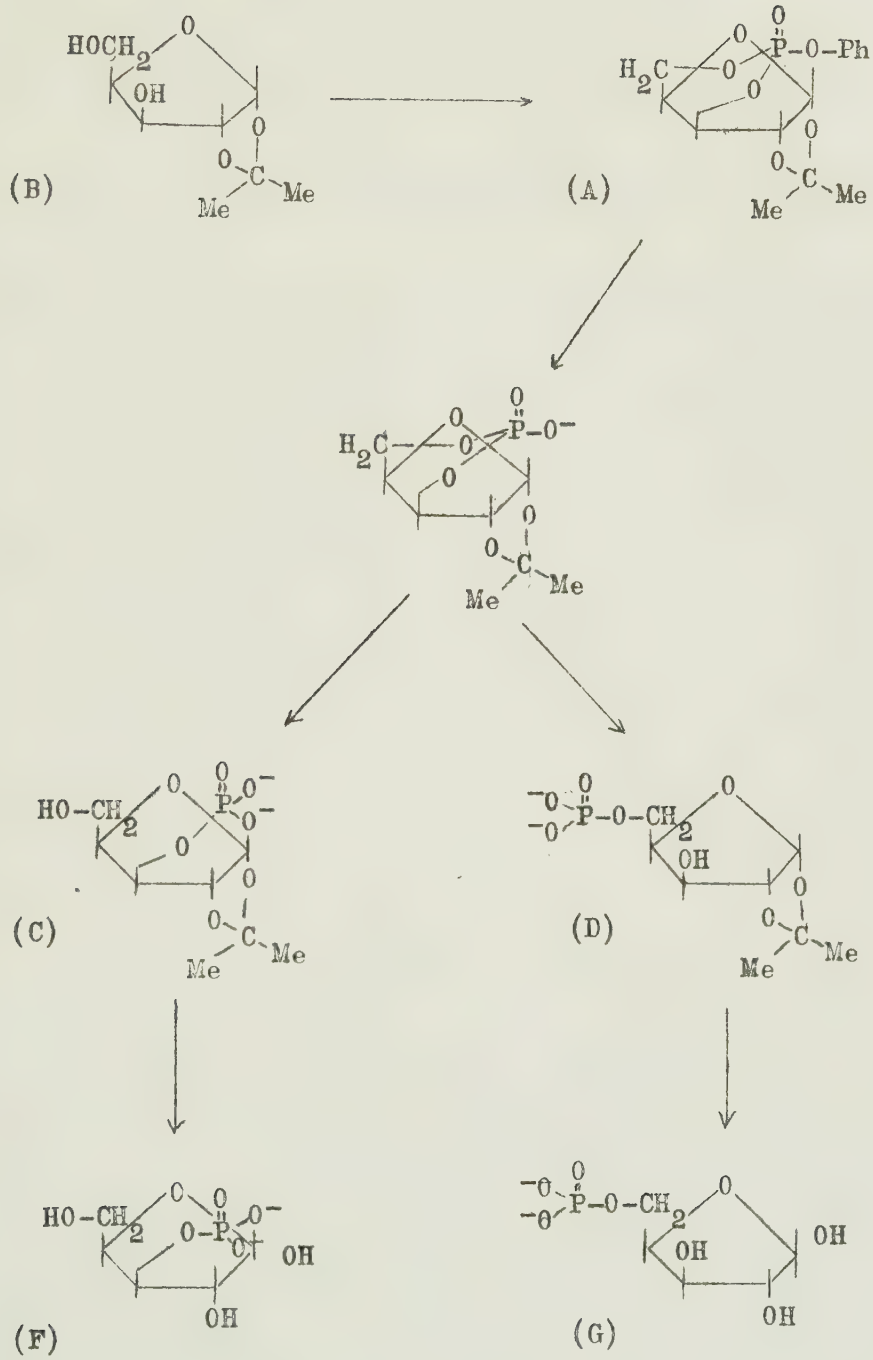


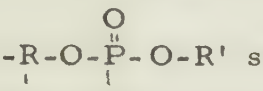
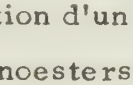
Tous les cycles phosphorylés dont nous venons de parler, qu'ils furent synthétisés ou supposés comme intermédiaires de réactions, comportaient cinq chaînons. Le premier cycle à six chaînons fut le méthyl-α-D-glucoside-4,6-phosphate, préparé par BADDILEY, BUCHANAN et SZABÓ (31) en traitant le méthyl-α- D-glucoside-4,6-

phényl phosphate par hydrogénolyse sur platine d'Adams. On avait déjà soupçonné l'existence d'un tel cycle à la suite des travaux de LEVENE et RAYMOND (32) qui avaient vainement tenté de synthétiser le xylose-3-phosphate sans passer par l'intermédiaire d'un cycle, par phosphorylation directe du 1,2 isopropylidène-5-O-acylxylofuranose. Après l'élimination des groupes protecteurs en milieu acide, ils ne trouvaient que du xylose-5-phosphate ; dans ce milieu, le phosphate migrait de l'hydroxyle en 3 à celui en 5 et cette migration devait se produire par l'intermédiaire d'une cyclisation, non plus sur un hydroxyle secondaire voisin du phosphate, mais sur l'hydroxyle primaire qui est assez éloigné, et le cycle ainsi formé comportait six atomes.

En 1957, MOFFATT et KHORANA (33) synthétisèrent le xylose-3-phosphate par hydrolyse alcaline du 1,2 isopropylidène xylofuranose-3,5-phosphate cyclique (A). Ils obtenaient cet autre cycle à six chaînons par action du dichlorophényl-phosphate sur le 1,2-isopropylidène xylofuranose (B). Pour hydrolyser le groupe phényle du triester phosphorique et ouvrir le cycle en un mélange de 1,2 isopropylidène xylofuranose 3 et 5 phosphate (C et D) KHORANA et MOFFATT ont soumis le 1,2 isopropylidène xylofuranose 3,5-phényl phosphate à un traitement alcalin puis ils libéraient le phosphate de sucre du groupe isopropylidène par une hydrolyse acide très ménagée (E et F).

La séparation des deux phosphates de sucre isomères s'effectue ensuite par chromatographie sur résine.


(B)
(A)
(C)
(D)
(F)
(G)

Au fur et à mesure que les recherches progressaient dans le domaine des esters phosphoriques cycliques, d'autres problèmes se levaient. Ainsi dans un travail en collaboration avec TENER, WRIGTH et KHORANA, MOFFATT (34) étudie les propriétés des cycles à cinq ou six chaînons et avance que dans les composés de formule générale :  si l'hydroxyle est dans une position favorable, il se produit en milieu acide ou alcalin une transestérification conduisant à la formation d'un composé cyclique:  . Il constate de plus que les monoesters phosphoriques des composés polyhydroxylés par le dicyclohexylcarbodiimide fournissent invariablement un diester cyclique à cinq chaînons même si la formation d'un cycle à six chaînons, est stériquement possible. Le premier cycle à sept chaînons, d'ailleurs non fermé sur un glucide : le butane diol 1,4 phosphate cyclique fut synthétisé par MOFFATT et al. (34) qui ont par la suite comparé les stabilités des cycles phosphorylés suivant le nombre d'atomes qui les composent. Dans cette étude il ressort que les cycles à cinq chaînons sont beaucoup plus sensibles que ceux à six chaînons envers les acides et les bases.

P. SZABÓ et L. SZABÓ (35) synthétisèrent un cycle à sept chaînons bâti sur les hydroxyles en 3 et 6 du glucofuranose et apportèrent à la théorie de MOFFATT l'argument supplémentaire que les cycles à cinq chaînons se forment de préférence même s'il est stériquement possible d'en créer à six ou sept chaînons. Ces mêmes auteurs (36) étudiant l'hydrolyse alcaline des cycles à six chaînons tels les méthyl-α-D-glucoside et-β-D-galactoside-4,6-phosphate cyclique ont observé que contrairement à ce qui se passe dans le cas de l'acide panthoténique -2,4-phosphate cyclique où l'on ne retrouve qu'un seul monoester, le 4

phosphate (37), ces phosphates de sucre s'hydrolysaient en un mélange de 4 et 6 phosphate sans que les hydroxyles en 2 et 3 interviennent dans la réaction.

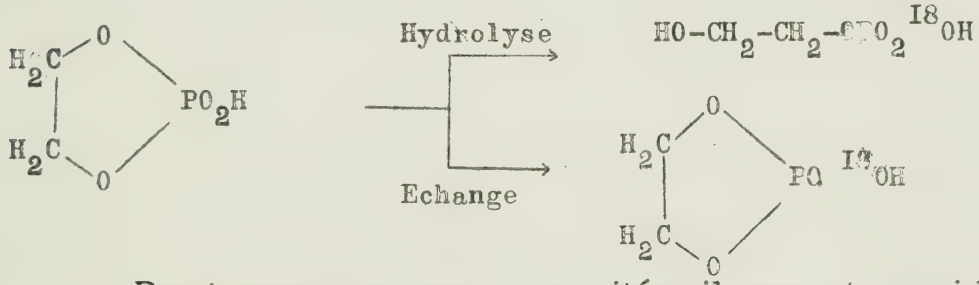
La cinétique de l'hydrolyse des esters phosphoriques a été étudiée dès 1942; BAILLY et DESJOBERT (38, 39), les premiers montrèrent que l'hydrolyse du glycérol phosphate et de l'éthyl phosphate était maximale à un pH d'environ 4 BUTCHER et WESTHEIMER (40) obtinrent la même résultat avec le-2-méthoxypropyl-1-méthyl éthyl phosphate et constatèrent que cet ester optiquement actif était hydrolysé avec une rétension totale de configuration qui indiquait la fission de la liaison P-O. OLDHAM(41) avec de l'eau marquée en ^{18}O hydrolysa le méthyl phosphate à pH 4 et retrouva du méthanol et du phosphate inorganique totalement enrichi en ^{18}O il annonça alors que seule la liaison P-O était clivée.

Des expériences faites sur le β -D-glucose 1 phosphate(42) révélèrent que si à des pH compris entre 1 et 4 l'hydrolyse se faisait par fission de la liaison C-O, à pH 6 ou 7, elle avait lieu par rupture de la liaison P-O.

VERNON et ses collaborateurs (43) rapportent que dans l'hydrolyse de l'aglycone des glucosides, les deux mécanismes avaient été observés, et qu'il était difficile d'établir exactement le processus de la réaction.

L'hydrolyse alcaline des triesters de l'acide phosphorique a été fort peu étudiée. Les premiers travaux sur ce sujet ont étéfaits par BARNARD, VERNON et THAIN (41) sur les triéthyl, triméthyl et triphényl phosphate qui, en solution dans du dioxanne aqueux, s'hydrolysent au contact d'une base par rupture de la liaison P-O. En milieu acide, les résultats obtenus sont moins nets et ne permettent pas d'affirmer le sens de la réaction.

Les derniers travaux parus sur l'hydrolyse des esters phosphoriques sont ceux de HAAK et WESTHEIMER (44). On savait depuis longtemps que l'hydrolyse des esters phosphoriques à cinq chaînons, à cause des tensions internes du cycle, était beaucoup plus rapide que celle des esters à chaînes ouvertes correspondants (7,23,25,45,46, 47,48). Ainsi par exemple, la chaleur d'hydrolyse du méthyl éthylène phosphate est de 7 à 9 K cal/ mol, supérieure à celle du diméthyl hydroxyéthyl phosphate (49). HAAK et WESTHEIMER conduisirent leurs travaux sur l'hydrolyse de l'éthanediol 1,2 phosphate en solution acide ou basique enrichie en ^{18}O, et observèrent que quelles que soient les conditions, la rupture de la liaison P-O se produit environ 300 fois plus vite que celle de la liaison C-O, et que cette dernière ne se fait à peu près pas ; mais si dans un milieu alcalin, il n'y a pas d'échange entre l'oxygène du solvant et un oxygène du phosphate ce phénomène a lieu en milieu acide. Les auteurs symbolisèrent ces réactions par les équations suivantes :



Des travaux que nous avons cités, il ressort que si les monoesters et les diesters phosphoriques des glucides ont été très étudiés, l'hydrolyse des triesters est fort peu connue. KHORANA seul précise que le 1,2 isopropylidène xylofuranose 3,5-(phényl phosphate) est hydrolysé en milieu alcalin avec perte du groupe phényle (33)

Dans le travail que nous présentons, nous avons étudié les cas des méthyl et phényl glucosides et phényl galactoside 4,6 (phényl

phosphate) et constaté que quand un hydroxyle voisin du phosphate est libre, ce qui n'était pas le cas dans le 1,2 isopropylidène xylofuranose 3,5-(phényl phosphate) synthétisé par KHORANA (32), ces triesters subissent en milieu alcalin, une transestérification intramoléculaire aboutissant à la formation de glycosides 3 et 4 phosphate.

Nous avons démontré que la nature du groupe aglycone influe sur les proportions des monoesters formés pendant l'hydrolyse alcaline des glycosides 4,6 phosphate cyclique. Cette influence du groupe aglycone se manifeste aussi sur l'acidité de ces esters phosphoriques et sur les réactivités des hydroxyles libres sur la molécule du glycoside.

Nous avons synthétisé tous les monoesters de l'acide phosphorique des phényl glucosides et galactosides et nous avons mis au point des méthodes pour les analyser sur résines échangeuses d'ions.

Nos observations pendant ces analyses ou ces synthèses semblent être des points de départ intéressants pour des travaux ultérieurs, surtout que COLLINS (50) vient de mettre en évidence dans des produits naturels l'existence de triesters phosphoriques.

CHAPITRE I

ESTERS PHOSPHORIQUES DU PHENYL -β-D-GLUCOSIDE

La difficulté principale dans la synthèse des phosphates de sucre est de conserver libre la fonction hydroxyle choisie pour être phosphorylée tout en protégeant les autres par des radicaux qui peuvent être facilement éliminés par la suite sans que le groupe phosphate introduit soit éliminé simultanément ou que sa position initiale soit modifiée. En effet, les esters phosphoriques peuvent être hydrolysés en milieu acide ou basique ; de plus, les mono-esters sont sujets à migration en milieu acide (3,4,5,32,51, 52) tandis que en milieu basique les diesters peuvent subir une transestérification(25,54).

Comme groupes protecteurs nous avons choisi les radicaux benzyle, acétyle, benzoyle et benzylidène.

Le radical protecteur de choix est le groupe benzyle, car il peut être enlevé en milieu neutre par hydrogénolyse et peut donc être toujours utilisé. Son emploi est cependant limité, car son introduction sélective est très malaisée. Par exemple, la benzylation du triacétyl levoglucosane ne donne que 12 % du dérivé 2,4-dibenzylé à côté de quelque 80 % de tribenzyl-levoglucosane (55).

Les groupes benzoyles et acétyles sont hydrolysés en milieu alcalin où les mono-esters de l'acide phosphorique sont stables. Ils s'avèrent alors excellents protecteurs des hydroxyles contre une attaque ultérieure d'un agent phosphorylant.

Enfin le groupe benzylidène a permis dans nos synthèses

de bloquer simultanément les hydroxyles sur les carbones 4 et 6 des glycopyranosides. Son utilisation présente l'inconvénient majeur que son élimination se fait en milieu légèrement acide ; or, on sait que les monoesters de l'acide phosphorique peuvent subir une migration dans ces conditions (3,4,5,32,51). Son emploi est cependant justifié dans le cas des hexopyranosides phosphorylés puisqu'il a été démontré qu'aucune migration du résidu phosphorique n'a lieu lors de l'hydrolyse acide des méthyl-4,6-benzylidène gluco-et galactopyranosides-2-et-3-phosphate (36).

Pour introduire le groupe phosphate dans la molécule de glycoside nous avons utilisé trois agents phosphorylants : l'oxychlorure de phosphore (56,57), le diphényl chlorophosphate (58) et le dichlorophénylphosphate(31).

Le premier de ces réactifs est utilisé depuis longtemps, puisque Emile FISCHER(59) s'en est servi pour phosphoryler, entre autres, le théophylline glucoside, mais son utilisation est limitée par son caractère polyfonctionnel: en effet, il est nécessaire d'en utiliser un excès pour éviter toute formation de phosphates secondaires où deux molécules de substrat seraient liées par un radical phosphate. Par ailleurs la purification du produit phosphorylé n'est pas aisée sauf si le produit phosphorylé est insoluble dans l'eau. A titre d'exemple, dans le cas du théophylline glucoside phosphate mentionné plus haut, après élimination des ions chlorures par traitement avec du sulfate d'argent, on précipite l'argent en excès avec l'hydrogène sulfuré, aère la solution, libère la pyridine par addition de baryte et l'élimine par distillation et finalement précipite l'excès des ions baryum par addition de la quantité équivalente d'acide sulfurique. L'utilisation de groupes protecteurs fortement hydrophobes, tels le benzoyl et le benzylidène nous a heureusement donné des produits phos-

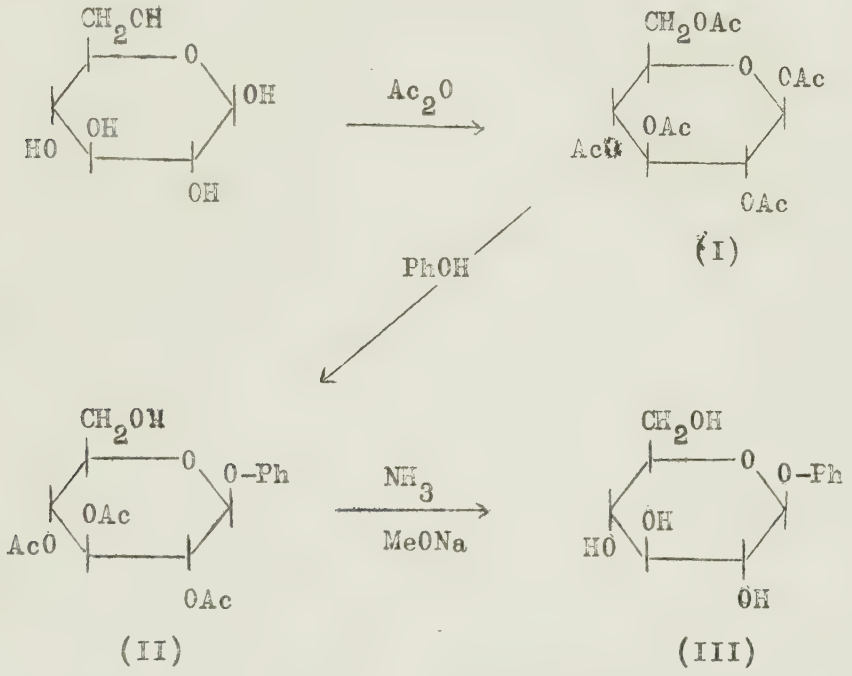
phorylés dont même les sels de pyridinium étaient insolubles dans l'eau, de sorte qu'un simple lavage a permis d'éliminer toutes les impuretés.

Le dichloro phénylphosphate nous a servi pour la synthèse des phosphates cycliques, mais dans certains cas, nous avons pu l'utiliser pour la synthèse de monophosphates. Nous donnerons des détails sur son choix et son utilisation lors de la description des synthèses particulières.

Quand au diphényl chlorophosphate, il est le réactif de phosphorylation de choix pour obtenir des monophosphates ; il est monofonctionnel, le triester phosphorique formé est stable (exception faite pour le cas où un groupe hydroxyle se trouve sur le carbone voisin), en général insoluble dans l'eau, donnant par hydrogénolyse l'ester phosphorique du produit cherché avec un bon rendement. Il n'est cependant pas possible de l'utiliser pour la synthèse des phényl glycosides phosphorylés, car d'un côté la stabilité du triester formé interdit d'en libérer le phosphate par hydrolyse alcaline des groupes phényles, d'un autre côté l'hydrogènolyse n'est pas applicable à cause du groupe phényle glycosidique qui serait alors enlevé simultanément.

Pour préparer le phényl-β-D-glucoside, nous avons employé la méthode mise au point par MONTGOMERY et RICHTMEYER (60). On synthétise d'abord le penta-O-acétyl-β-D-glucopyranose (I) par action de l'anhydride acétique sur le sucre en présence d'acétate de sodium ; puis par fusion du phénol avec le pentaacétate en présence d'acide paratoluène-sulfonique (61) , on obtient le phényl tétraacétyl-β-D-glucoside (II), que l'on désacétyle soit par de l'ammoniac ou bien à l'aide de méthoxyde de sodium (III). La première méthode nous a donné de moins bons rendements que la dernière. Pour celle-ci ZEMPLEN (62) préconise d'ajouter une petite quantité de méthoxyde

de sodium à une solution diluée du dérivé acétylé dans du méthanol anhydre ; mais il est préférable d'utiliser la méthode de LEABACK (63) fondée sur le même principe, mais où le phényl tétra-O-acétyl-β-D-glucoside est en solution concentrée et le phényl-β-D-glucoside cristallise au fur et à mesure de sa formation.



N.B. Symboles utilisés dans les formules pour les différents groupes :

Ac = Acétyle = CH_3CO Bz = Benzoyle = C_6H_5CO

Me = Méthyle = CH_3 Ph = Phényle = C_6H_5

Nous avons appelé monophosphates les monoesters de l'acide phosphorique formés avec les glucides.

PREPARATION DU PHENYL-β-D-GLUCOSIDE 4,6-PHOSPHATE CYCLIQUE

Pour cette synthèse nous sommes parti du phényl glucoside (111) que nous avons phosphorylé à l'aide de dichlorophényl phosphate pour obtenir le phényl glucoside 4,6 (phényl phosphate) (1V). Comme on sait qu'une hydrogénolyse en présence de platine enlève simultanément les deux groupes phényles de la molécule, nous nous sommes adressé à une méthode de MOFFATT et KHORANA (33) qui ont démontré qu'il est possible d'hydrolyser sélectivement en milieu alcalin le groupe phényle lié à unphosphate cyclique à six chaînons, et nous avons isolé le phényl-β-D-glucoside 4,6-phosphate (V) sous forme de cyclohexylammonium. Le produit a été caractérisé, en plus de l'analyse élémentaire, par un titrage potentiométrique ne révélant qu'une seule dissociation acide et par un titrage périodique qui démontrait la consommation lente d'un seul équivalent de l'oxydant, correspondant à la présence d'un seul diol vicinal dans la molécule.

Cependant nous avons observé que, pendant l'hydrolyse alcaline du phényl-β-D-glucoside 4,6-(phényl phosphate), il se forme à coté du phosphate cyclique, une ou plusieurs substances qui, d'après leur comportement sur chromatogrammes, semblent être des monophosphates du phényl glucoside. Ces substances n'étaient pas des produits d'hydrolyse du phényl glucoside 4,6-phosphate qui, (nous l'avons démontré) est stable dans les conditions expérimentales utilisées pour l'hydrolyse du phényl glucoside 4,6-(phényl phosphate).

Dans le travail cité plus haut, MOFFATT et KHORANA (33) ont utilisé une hydrolyse alcaline pour obtenir le 1,2-O-isopropylidène D-xylofuranose 3,5 hydrogène phosphate à partir du phényl phosphate correspondant. Dans ce glucide, tous les groupes hydroxyles sont blo-

qués, tandis que le phényl glucoside 4,6-(phényl phosphate) possède deux groupes hydrolyles libres. Bien que ceux-ci n'interviennent pas dans l'hydrolyse du phényl glucoside 4,6- (hydrogène phosphate) qui est un diester de l'acide phosphorique et se présente dans les conditions de la réaction comme un anion monovalent, il était concevable que ces mêmes groupes hydroxyles participeraient à l'hydrolyse du triester neutre que représente le phényl glucoside 4,6-(phényl phosphate) (IV).

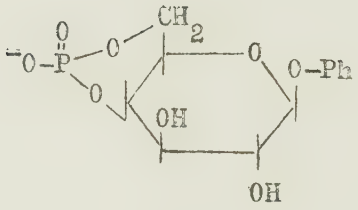
Nous avons alors isolé la fraction des monophosphates en utilisant une colonne de cellulose "Chromax" L.K.B.

L'analyse élémentaire bien qu'en dehors des limites permises, indiquait clairement qu'il s'agissait d'un ou de plusieurs monophosphates du phényl-β-D-glucoside. (Nous avions en effet affaire à un mélange de sels de baryum et nous ne savions pas avec combien de molécules d'eau cristallisait chacun des composés). L'absorption dans l'ultra-violet confirmait la présence du groupe phényle et un titrage potentiométrique révélait deux dissociations acides. En effectuant un titrage périodique, nous avons pu constater qu'il n'y avait qu'un quart d'équivalent de périodate consommé. Il ne pouvait donc s'agir que d'un mélange de monophosphates composé en majeure partie de phényl-β-D-glucoside 3 phosphate(qui ne consomme pas de périodate) et d'un ou de plusieurs autres monophosphates possédant un système diol.

Nous avons alors analysé le mélange sur une colonne de Dowex 1 x 2 en forme borate.

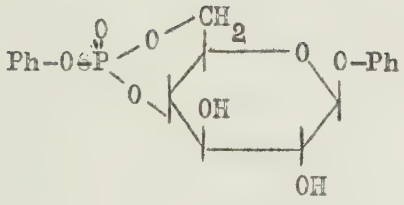
Nous avions auparavant sur cette même colonne déterminé les conditions et les positions d'élution des monophosphates du phényl-β-D-glucoside obtenus par des synthèses sans équivoque. Il est apparu que le mélange de monophosphates était constitué de phényl-β-D-glucoside-3-phosphate (VII) et de phényl-β-D-glucoside-4-phosphate

(VI), le phényl-β-D-glucoside-6-phosphate en étant absent.

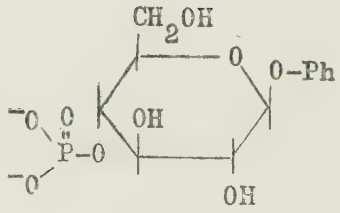


(V)

+

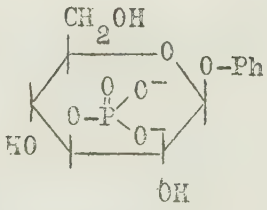


(IV)



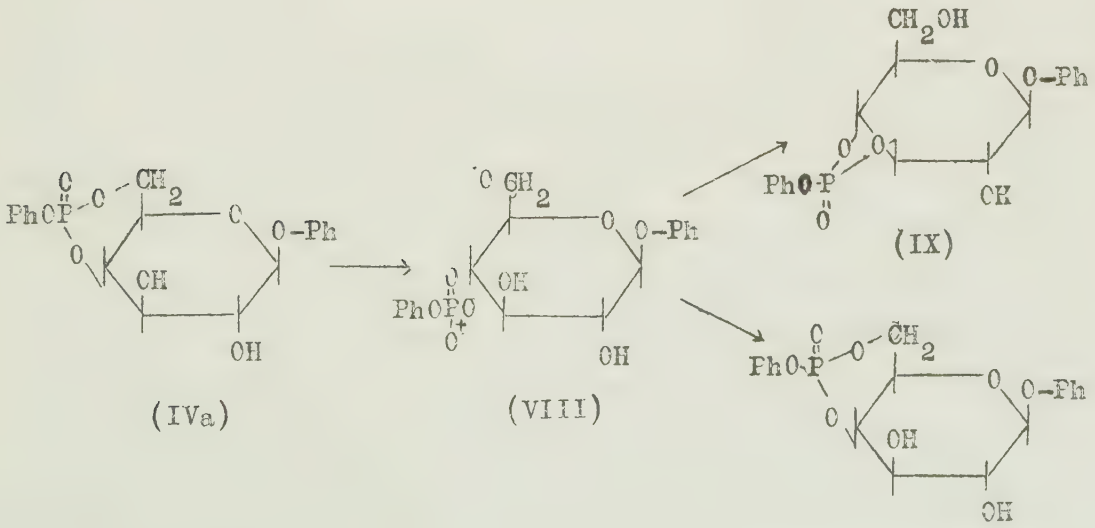
(VI)

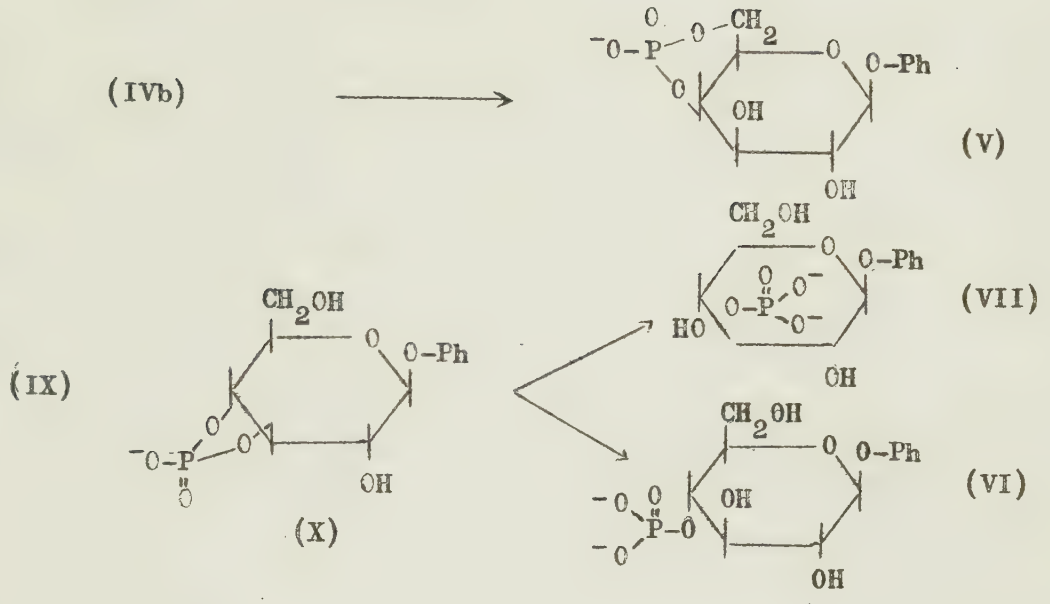
+



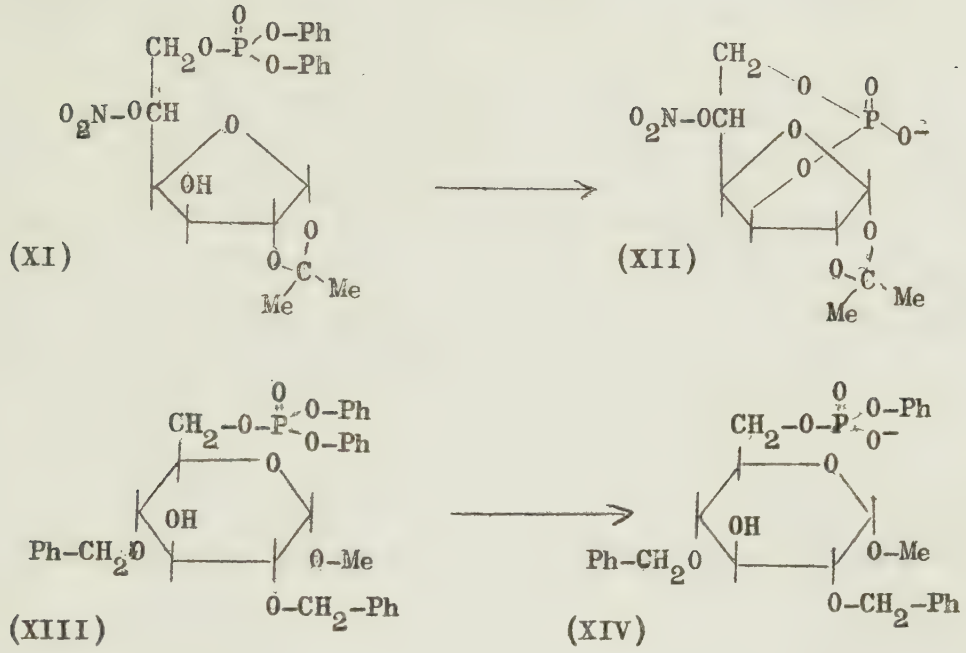
(VII)

La formation du phényl-β-D-glucoside-3-phosphate pendant le traitement alcalin du phényl-β-D-glucoside-4,6-(phényl phosphate) (IV) ne peut s'expliquer que par transestérification. Comme on ne retrouve pas de phényl-β-D-glucoside-6-phosphate parmi les produits de la réaction, il doit se produire d'abord la rupture de la liaison P-O-C_6 : ceci donne le phényl glucoside-4-phényl phosphate (VIII). Une recyclisation est alors possible soit sur l'hydroxyle en 6 (IV b), soit sur celui en 3 (IX). dans le premier cas le phosphate cyclique se retrouvera avec le produit principal de la réaction : le phényl-β-D-glucoside-4,6-phosphate (V) ; dans le second un cycle à cinq membres est formé (X) qui, instable en milieu alcalin s'hydrolyse pour donner un mélange de phényl-β-D-glucosides 3 (VII) et 4 (VI) phosphate. La prédominance du 3 phosphate dans ce mélange s'explique par la plus grande réactivité du groupe hydroxyle en 3 déjà observée lors de la benzoylation sélective du benzylidène phényl glucoside : la liaison C_3-O-P- plus stable que celle de C_4-O-P- favorise la formation du phényl glucoside 3 phosphate.





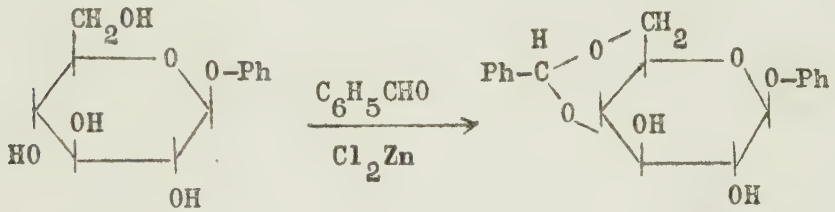
On ne sait pas si l'hydrolyse du phényle lié au phosphate précède ou suit la formation des cycles intermédiaires des glucosides 3,4-et-4,6-phosphate, mais on suppose plutôt qu'elle a lieu après la cyclisation. En effet si on traite le 1,2 isopropylidène-glucofuranose -5-nitrate-6-diphényl phosphate (XI) par une solution de potasse, on obtient le 1,2 isopropylidène glucofuranose 5 nitrate 3,6-phosphate cyclique (XII); mais le méthyl 2,4 dibenzyl- -D-glucoside 6 diphényl phosphate(XIII) traité dans les mêmes conditions fournit le méthyl 2,4 dibenzyl-6-phényl phosphate (XIV) : le glucoside est dans ce cas en forme pyranoïde et il faut exercer une plus grande tension sur le cycle phosphorylé pour former le-3,6-phosphate. Ainsi ces constitutions tendraient à démontrer que pour hydrolyser le groupe phényle du phosphate il faut que les deux autres fonctions de l'acide phosphorique soient estérifiées.



Nous n'avons pas trouvé parmi les produits de la réaction de phényl glucoside-2-phosphate ; s'il s'en forme, ce n'est qu'en quantité négligeable. Pourtant sur les modèles moléculaires, il est assez aisé de la construire, mais comme sans doute l'hydroxyle en 2 paraît moins réactif que celui en 3, le phényl glucoside-3,4-phosphate intermédiaire doit se former de préférence.

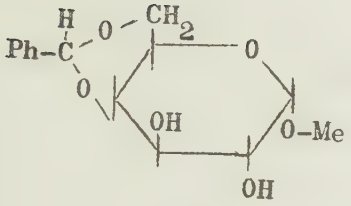
SYNTHESE DU PHENYL-β-D-GLUCOSIDE-2-PHOSPHATE

Pour cette synthèse, nous avons protégé d'abord les groupes hydroxyles en 4 et 6 par le groupe benzylidène (XV) en condensant le phényl glucoside (111) avec du benzaldéhyde en présence de chlorure de zinc. La méthode est celle de MAC CLOSKEY et COLEMAN (64) qui ont adapté au phényl glucoside la méthode élaborée par FREUDENBERG TOEPFER et ANDERSEN (65) pour le méthyl glucoside.



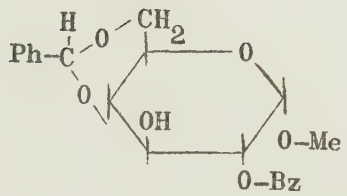
(III) (XV)

Pour déterminer les réactivités relatives des deux groupes hydroxyles libres du méthyl-4,6-benzylidène-β-D-glucoside (XV1), R. JEANLOZ et D. JEANLOZ (66) l'ont traité de deux manières différentes soit avec un équivalent de chlorure d'acétyle ou de benzoyle ou bien avec l'anhydride acétique ou benzoïque. Ils ont trouvé que les proportions des deux dérivés monoacylés (XV11 et XV111) varient suivant le réactif employé ; mais quel que soit le mode opératoire une attaque préférentielle a lieu sur le groupe hydroxyle en 2 quand on utilise les chlorures d'acides(XV11) et sur celui en 3 si l'on effectue l'acylation à l'aide d'anhydrides (XV111).



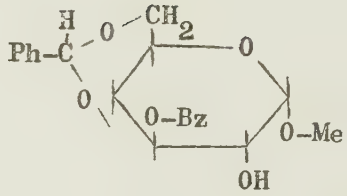
(XVI)

RCOCl

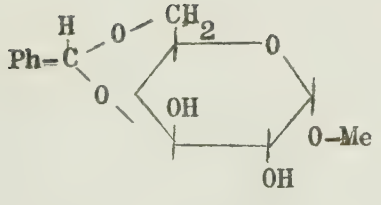


(XVII) 24%

+

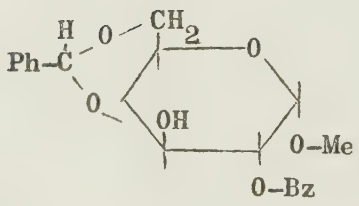


(XVIII) 6%



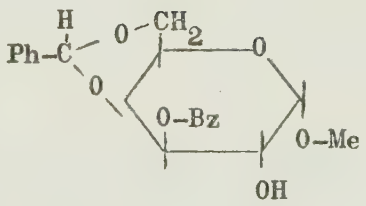
(XVI)

$(RCO)_2O$



(XVII) 13%

+



(XVIII) 22%

Par analogie, nous nous attendions donc à obtenir le phényl 4,6-benzylidène-2-O-benzoyl-β-D-glucoside en traitant le benzylidène phényl glucoside avec un équivalent de chlorure de benzoyle. Lors de

la séparation sur alumine des produits formés dans cette réaction, nous avons tout d'abord constaté que dans le cas du phényl-β-D-glucoside, il ne se forme qu'un seul dérivé monobenzoylé (XX) contrairement à ce qui a été observé par JEANLOZ avec le méthyl-α-D-glucoside. Si l'autre isomère est également formé, sa quantité est négligeable. En tout cas, nous n'avons jamais pu le mettre en évidence. D'autre part, il se forme une quantité appréciable de dibenzoate (XIX), ce qui semble démontrer que le groupe hydroxyle libre dans le mono-benzoyl-benzylidène phényl glucoside est plus réactif que les groupes hydroxyles dans les composés de départ. En effet, nous avons toujours retrouvé une grande proportion de benzylidène-phényl glucoside non attaqué par le chlorure de benzoyle.

Le monobenzoyl-benzylidène phényl glucoside (XX) a été caractérisé par son analyse élémentaire et par son spectre infra-rouge dans lequel on trouve une forte bande d'absorption dans la région de 3600 cm^{-1} correspondant à la fréquence OH dans la molécule. Comme nous l'avions dit plus haut, à la suite des travaux de JEANLOZ, nous pouvions penser que le groupe benzoyle était lié à l'hydroxyle du carbone 2.

Nous avons alors phosphorylé ce monobenzoate avec de l'oxychlorure de phosphore dans de la pyridine à très basse température. Le sel de pyridinium du phényl-4,6-benzylidène monobenzoyl-β-D-glucoside monophosphate (XXI) étant insoluble dans l'eau grâce à la présence de trois groupes hydrophobes sur la molécule, nous avons pu le débarrasser par plusieurs lavages successifs de toutes les impuretés puis l'isoler et le cristalliser.

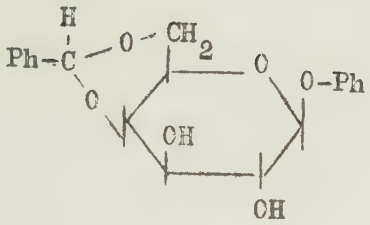
L'hydrolyse du groupe benzylidène s'effectue en milieu acide. Or dans ces conditions il peut se produire une migration du phosphate de sa position initiale vers un hydroxyle contigu. Il fallait donc empêcher que deux fonctions hydroxyles voisines du phosphate soient libres en même temps pendant cette réaction : on évitait ainsi une alternative

dans l'établissement de la structure du corps obtenu par la suite. Nous avons donc hydrolysé tout d'abord le groupe benzylidène en solution acide où le radical benzoyle reste stable, puis éliminé ce dernier à l'aide de méthoxyde de sodium sachant les monophosphates stables en milieu alcalin.

Le sel neutre d'un monophosphate du phényl-β-D-glucoside (XXII) a été isolé et caractérisé par analyse élémentaire. Un titrage potentiométrique démontrait qu'il s'agissait bien d'un mono-ester de l'acide phosphorique puisqu'il mettait en évidence deux dissociations acides. Si ce composé avait été le phényl-β-D-glucoside-3-phosphate, il n'aurait pas été oxydé par du periodate de sodium ; or nous avons constaté qu'il en consommait un équivalent. Il ne pouvait donc pas s'agir du 3-phosphate. Parmi les monophosphates du phényl glucopyranoside , il n'y a que deux isomères qui consomment un équivalent de periodate : ce sont le 2 et le 4 phosphate. La structure du phényl-4,6-benzylidène glucoside est établie, la position 4 était donc occupée dans la substance de départ. La formation du phényl-β-D-glucoside-4-phosphate ne s'expliquerait alors que par une migration du phosphate. Mais nous avions par ailleurs obtenu le phényl-β-D-glucoside-4-phosphate et nous avions pu le distinguer par chromatographie sur papier et sur résine échangeuse d'ions du corps dont nous venons de décrire la synthèse. Ce dernier ne peut être donc que le phényl-β-D-glucoside-2-phosphate (XXIII). Par conséquent l'ester benzoïque du benzylidène phényl-glucoside était le-3-(XXIV) et non pas le-2-benzoate, ce qui tendrait à démontrer que dans le benzylidène phényl glucoside, contrairement à ce qui se passe dans le cas du benzylidène méthyl glucoside, c'est le groupe hydroxyle situé sur le carbone 3 qui est le plus réactif.

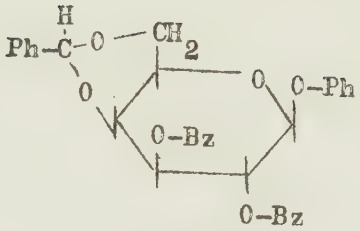
Nous n'avons pas essayé déffectuer une monobenzoylation du phényl- 4,6-benzylidène-β-D-glucoside avec de l'anhydride benzoïque puisque le but de nos recherches n'était pas d'étudier les réactivités relatives des hydroxyles en 2 et 3 du glycoside mais de n'avoir qu'un seul hydroxyle libre sur la molécule du phényl- 4,6-benzylidène-β-D-glucoside, ce à quoi nous sommes parvenu avec le chlorure de benzoyle.

Nous avons groupé dans la page suivante les schemas de réaction de la monobenzoylation du phényl-4,6-benzylidène- β-D-glucoside et de la phosphorylation conduisant au phényl-β-D- glucoside 2 phosphate.



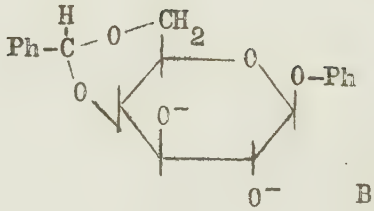
(XV)

ClBz



(XIX)

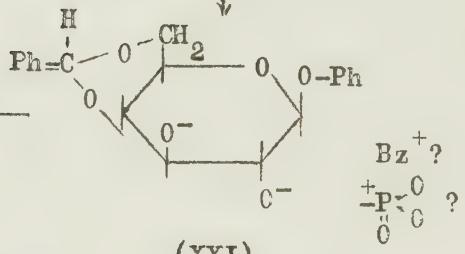
+



(XX)

Bz^+ ?

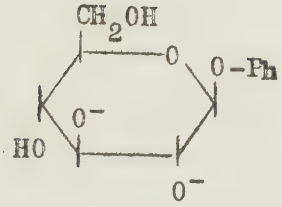
$POCl_3$



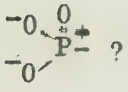
(XXI)

H^+

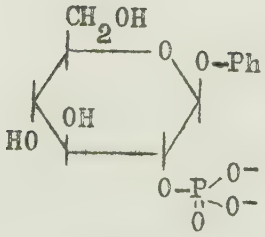
OH^-



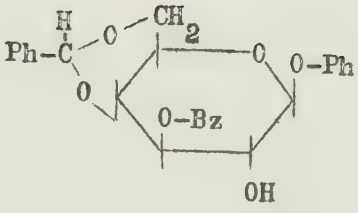
(XXII)



?



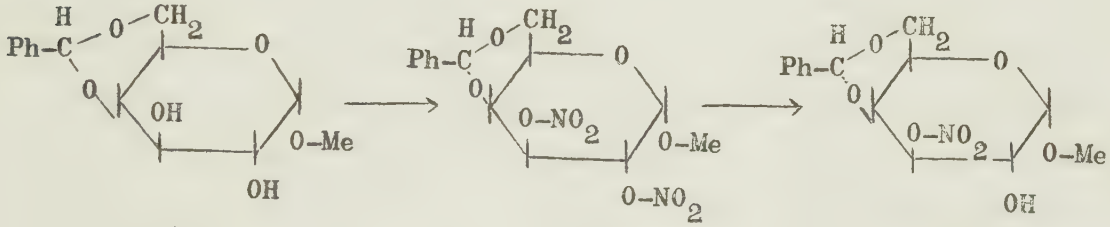
(XXIII)



(XXIV)

SYNTHESE DU PHENYL-β-D-GLUCOSIDE-3-PHOSPHATE

HONEYMANN et MORGAN (67) avaient préparé le méthyl-4, 6-benzylidène-α-D-glucoside-2, 3-dinitrate(XXV) en traitant par un mélange d'acide nitrique dans l'anhydride acétique le méthyl-4, 6-benzylidène(XVI) glucoside puis ils avaient enlevé un seul groupe nitrate, celui en 2, par action du nitrate de sodium et ils avaient isolé le méthyl-4, 6-benzylidène-α-D-glucoside-3-nitrate (XXVI) où seul l'hydroxyle en 2 est libre.

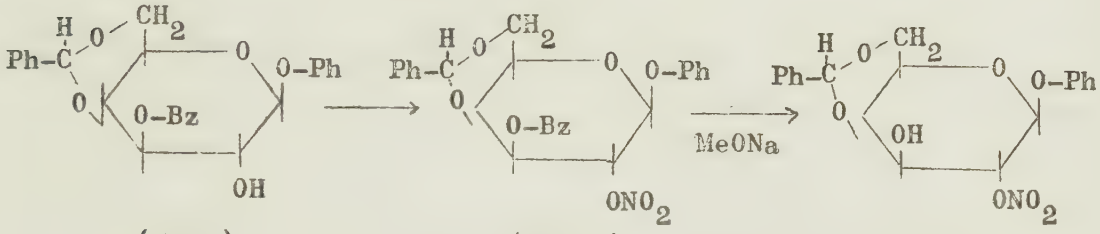


(XVI) (XXV) (XXVI)

Cette suite de réactions appliquées au 4, 6-benzylidène-β-D-glucoside avait l'avantage de fournir les intermédiaires pour les synthèses des phényl-β-D-glucosides-2-et-3-phosphate. Pour ce dernier, nous devions d'abord estérifier la fonction hydroxyle en 2 et libérer celle en 3 par hydrogénolyse sur platine.

Quand nous avons nitré le phényl-4, 6-benzylidène glucoside nous avons facilement obtenu le dinitrate correspondant, mais contrairement à ce qui se passe avec le méthyl glucoside , il n'a pas été possible d'éliminer seulement l'un des groupes nitrates : soit que l'on retrouve la substance de départ, ou bien, si on emploie des conditions de réaction plus énergiques que la molécule subît une décomposition profonde. Nous avons alors pensé conserver uniquement l'hydroxyle en 3 sur le glucoside par une autre voie. En partant du phényl-4, 6-benzylidène-3-benzoyl-β-D-glucoside (XXIV) que nous avions déjà synthétisé, nous voulions ni-

trer l'hydroxyle en 2 (XXVII) et libérer celui en 3 par la méthode de Zemplen (16)(XXVIII).



(XXIV) (XXVII) (XXVIII)

Ayant traité par le mélange acide nitrique, anhydride acétique le phényl-4,6-benzylidène-3-benzoyle-β-D-glucoside, nous avons pu isoler et cristalliser un dérivé nitré de ce corps dont l'analyse élémentaire indiquait bien qu'il s'agissait d'un mononitrate de ce glucoside. Cependant le spectre infra-rouge de ce corps présentait une bande dans la région de 3600 cm^{-1} indiquant que la fonction OH était toujours libre. Comme HONEYMANN et MORGAN précisent dans leurs travaux que leur mélange nitrant n'agit pas sur le groupe benzylidène, dans notre cas, la réaction n'a pu se faire que sur le groupe aglycone du glucoside ou sur le radical benzoyle. Comme on sait qu'il est assez difficile de nitrer l'acide benzoïque tandis que le phénol se nitre très facilement il est fort probable que c'est le groupe phényle du carbone 1 qui se trouve nitré. Mais nous n'avons pas poussé plus avant les investigations pour déterminer la place du nitrate, car ceci n'entrait pas dans le cadre de nos recherches. Puisqu'il nous a été pratiquement impossible de parvenir à une protection sélective de l'hydroxyle en 2 du glucoside, nous avons alors pensé atteindre le phényl-β-D-glucoside-3-phosphate par une autre voie. On savait que les cycles phosphorylés batis sur les hydroxyles d'un dérivé polyhydroxylé subissent une hydrolyse en milieu alcalin pour donner deux monophosphates. La stabilité de ces

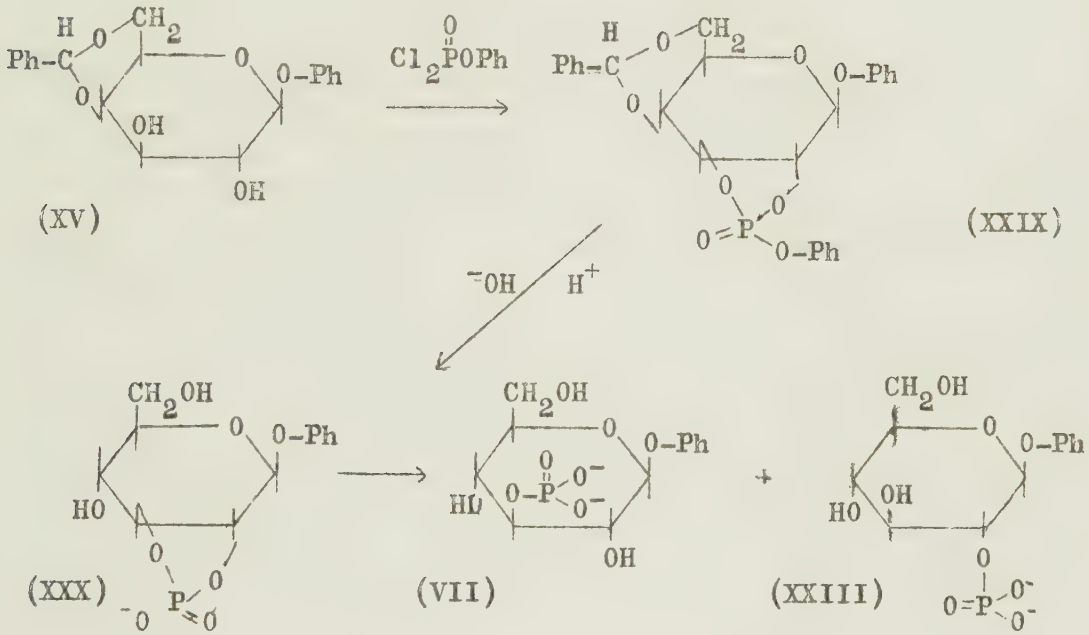
cycles dépend du nombre de leurs chaînons ; ceux à 6 chaînons pour être hydrolysés demandent des conditions de réaction plus énergiques que ceux à 5 chaînons. Nous avons donc envisagé de former un phosphate cyclique liant les hydroxyles libres du benzylidène phényl glucoside et de le traiter par une base pour obtenir un mélange de phényl-4,6 benzylidène-β-D-glucoside-2-et-3 phosphate. Or comme par nos expériences sur la monobenzoylation du phényl-4,6-benzylidène-β-D-glucoside, nous avions découvert que l'hydroxyle en 3 était le plus réactif, il fallait s'attendre à trouver dans le mélange de monophosphates une majorité de 3 phosphate.

Nous avons choisi le dichlorophényl phosphate comme agent phosphorylant et l'avons fait réagir sur le phényl-4,6-benzylidène-β-D-glucoside(XV). Le produit de la réaction qui est un corps huileux est bien un triester de l'acide phosphorique puisque ses solutions restent neutres même en conctact avec la résine en forme acide. Avec du benzène comme solvant de cristallisation, nous avons pu recueillir quelques cristaux dont les taux de carbone sont en dehors des limites tolérées, mais dont ceux d'hydrogène et de phosphate sont corrects et permettent de penser que nous avions isolé le triester à savoir le phényl-4,6-benzylidène-β-D-glucoside-2,3-phényl phosphate (XXIX). Mais nous avons ensuite soumis à un traitement alcalin ce produit selon la méthode de MOFFATT et KHORANA (33) pour éliminer le groupe phényle et hydrolyser le phosphate cyclique à cinq chaînons, puis enlevé le groupe benzylidène par hydrolyse acide ménagée. Nous avons pu alors mettre en évidence trois substances sur un chromatogramme:

1°. Une d'un Rf élevé, probablement le phényl-β-D-glucoside-2,3-phosphate (XXX).

2°. Le phényl-β-D-glucoside-2-phosphate comparé avec du 2-phosphate authentique (XXIII).

3°. Un corps d'un Rf un peu supérieur à celui du phényl-β-D-glucoside 2 phosphate (VII).



Après l'hydrolyse acide la solution a été neutralisée par de la cyclohexylamine. Puis en amorçant la cristallisation avec du phényl-β-D-glucoside 2 phosphate, nous avons pu isoler le phényl-β-D-glucoside 2 phosphate du mélange réactionnel.

L'autre monophosphate purifié également par cristallisation n'était pas oxydé par le periodate : il ne pouvait s'agir que du phényl-β-D-glucoside-3-phosphate (VII); puisque lui seul parmi les monophosphates du phényl glucopyranoside ne possède pas de système α-diol et de ce fait ne peut pas consommer de periodate.

SYNTHESE DES PHENYL-β-D-GLUCOSIDES-4-ET-6-PHOSPHATE

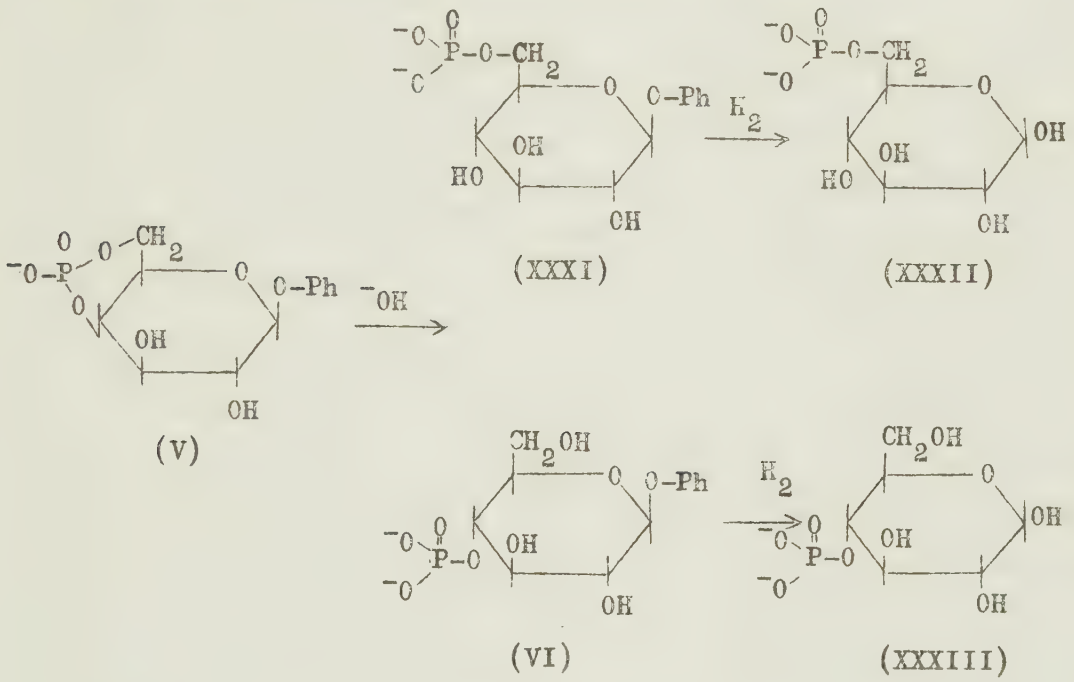
Les hydroxydes des métaux alcalino-terreux (en particulier le Ba) favorisent l'hydrolyse alcaline des diesters de l'acide phosphorique (37,68,69). Celle du méthyl-α-D-glucoside -4,6-phosphate cyclique fournit un mélange de méthyl-α-D-glucoside 4 phosphate et de méthyl-α-D-glucoside 6 phosphate (36). Comme parmi les produits de la réaction, on ne retrouve pas de méthyl glucoside 2, ni 3 phosphate, on peut supposer que les hydroxyles en 2 et 3 ne jouent aucun rôle dans cette réaction.

Dans les mêmes conditions d'hydrolyse, nous avons également obtenu à partir du phényl-β-D-glucoside-4,6-phosphate (V) un mélange de monophosphates (VI,XXXI) que nous avons pu mettre en évidence par chromatographie sur papier. La cristallisation fractionnée de leurs sels de cyclohexylamine nous a donné chacun de ces phosphates de sucre à l'état pur. Nous avons établi qu'il s'agissait bien de monoesters de l'acide phosphorique en effectuant sur chacun d'eux un titrage potentiométrique qui mettait en évidence deux dissociations acides.

Nous pouvions distinguer nettement sur un chromatogramme ces deux phosphates et, pour établir lequel du 6 (XXXI) et du 4 (VI) avait le Rf le plus bas, nous les avons oxydés par du périodate. L'isomère le moins mobile sur le chromatogramme consomme rapidement deux équivalents de périodate : il s'agit donc du 6 phosphate puisque seul parmi les monophosphates du glucoside, le phényl-β-D-glucopyranoside 6 phosphate peut réagir avec deux moles de periodate.

Le deuxième monophosphate ne consomme lentement qu'une seule mole de periodate comme le prévoit la théorie pour l'oxydation périodique du phényl-β-D-glucoside 4 phosphate. Pour compléter la détermination de la structure de ces deux composés, nous avons par

hydrogénolyse catalytique en milieu acide, éliminé le groupe aglycone de chacun des glycosides, puis nous avons comparé par chromatographie sur papier les produits de la réaction l'un (V1) avec le glucose-4-phosphate (XXX111), préparé suivant la méthode de REITHEL et CLAYCOMB (70), l'autre (XXX1) avec du glucose-6-phosphate authentique (XXX11) . Dans chaque cas les Rf étaient identiques.



Sûr de la structure des monophosphates formés dans l'hydrolyse alcaline du phényl-β-D-glucoside 4,6-phosphate cyclique il nous restait à calculer leurs proportions relatives.

Dans des essais préliminaires, nous avons évalué ce rapport par chromatographie élutive sur papier en mesurant aux rayons ultraviolets l'absorption du groupe phényle. Ainsi nous avons pu déterminer qu'il y avait environ deux fois plus de 4 phosphate que de 6 phosphate. Par chromatographie sur résine échangeuse d'ions, nous avons trouvé des résultats analogues. C'est également par chromatographie sur résine que l'on a comparé (36) les quantités des monophosphates formés

pendant l'hydrolyse du méthyl glucoside-4,6-phosphate cyclique et trouvé qu'il se forme quatre à cinq fois plus de méthyl-α-D-glucoside 4 phosphate que de méthyl-α-D-glucoside-6-phosphate.

Ni la configuration du cycle phosphorylé sur le glucoside, ni la position α ou β du groupe aglycone ne semblent avoir d'influence sur ces proportions. En effet que l'on hydrolyse le phényl-β-D-glucoside-4,6-phosphate où le phosphate est bâti en trans sur le glucoside ou le phényl-β-D-galactoside-4,6-phosphate où le phosphate est en cis, on obtient toujours deux à trois fois plus de-4-phosphate que de 6 phosphate, et, dans l'hydrolyse du méthyl-β-D-galactoside ou du méthyl-α-D-glucoside-4,6-phosphate, on retrouve quatre à cinq fois plus de -4-phosphate que de 6 phosphate (36). C'est donc bien la nature du groupe aglycone qui unflue sur l'ouverture du cycle phosphorylé.

Il est possible que la présence sur le carbone 1 du glycoside d'un radical accepteur d'électrons tel le phényle dans les phényl-glycosides augmente la force de liaison : $P\text{-}O\text{-}C_6$ tandis qu'un radical donneur d'électrons, tel le méthyle, la rend plus labile. Cette action pourrait s'opérer par l'intermédiaire de l'oxygène du cycle pyranoïde, car il est peu probable que cet effet se manifeste au travers des autres carbones du glycoside.

Evidemment nos expériences ne sont pas assez nombreuses pour conférer à cette explication un caractère d'absolu. Il faudrait pour s'en assurer effectuer cette même hydrolyse sur d'autres glycosides-4,6-phosphate cyclique où les groupes aglycones seraient différents et plus ou moins substitués. Nous n'avons formulé cette hypothèse que comme point de départ de travaux ultérieurs qui pourront l'appuyer ou la détruire.

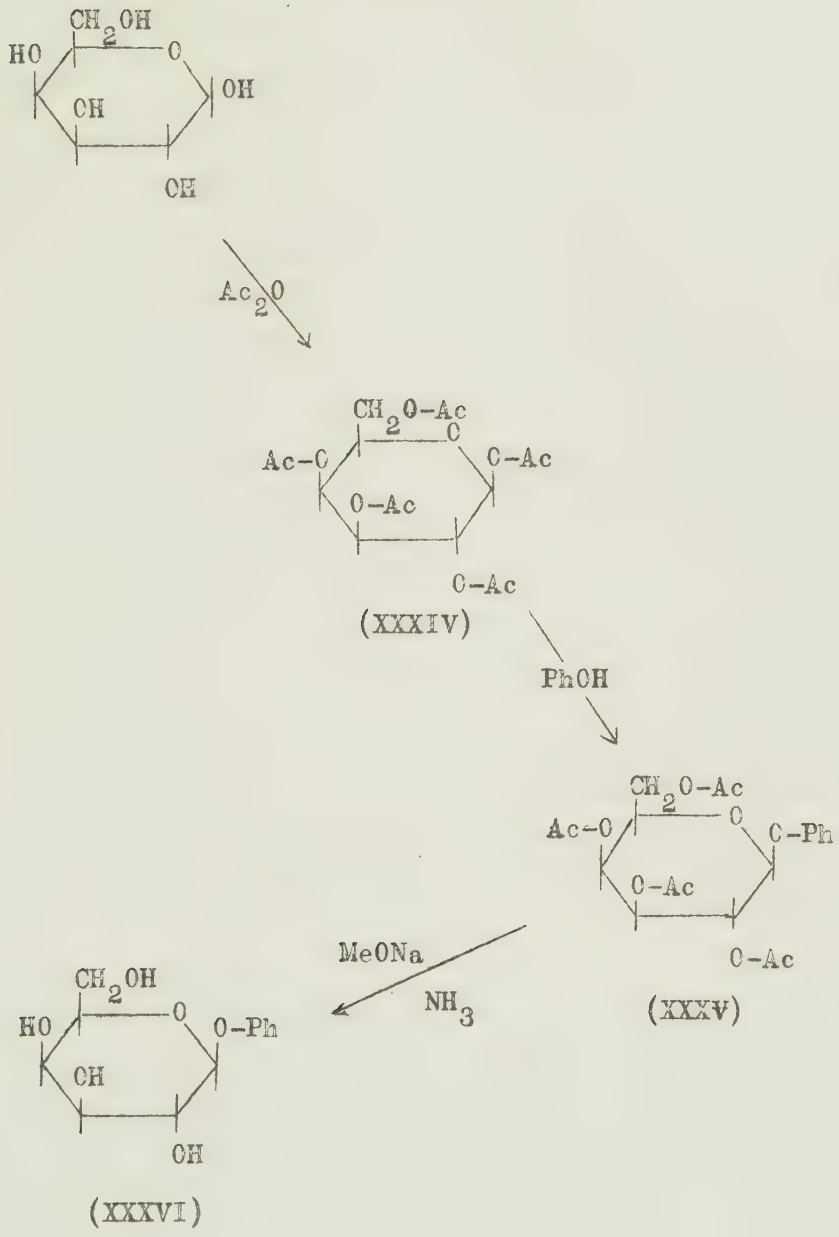
CHAPITRE II

ESTERS PHOSPHORIQUES DU PHENYL-β-D-GALACTOSIDE

Les monophosphates du phényl-β-D-galactoside ont été préparés par des suites de réactions analogues à celles utilisées pour la synthèse des monophosphates du phényl-β-D-glucoside.

SYNTHESE DU PHENYL -β-D-GALACTOSIDE

Pour préparer ce glycoside on transforme d'abord le galactose en pentaacétate (XXXIV) à l'aide d'anhydride acétique en présence d'acétate de sodium selon la méthode de ERWIG et KOENIGS(71) modifiée par HUDSON (72). La réaction est beaucoup plus vive que dans le cas du glucose et doit être menée avec précaution surtout si l'on travaille à l'échelle relativement grande de 300 à 400 g. de sucre. Par fusion du pentaacétate avec du phénol en présence d'acide paratoluène sulfonique (61), on obtient le phényl tétra-O-acétyl-β-D-galactoside (XXXV).
La désacétylation se fait par des méthodes que nous avons mentionnées dans le cas du glucoside, mais si ce dernier peut être cristallisé facilement , il est beaucoup plus difficile d'obtenir et de purifier le galactoside (XXXVI). Ainsi même avec la méthode de LEABACK (63) qui donne les meilleurs résultats pour le glucoside, le phényl galactoside ne cristallise pas spontanément et ce n'est qu'après avoir éliminé les ions sodium et tout le méthanol que l'on peut le cristalliser dans le n-propanol solvant qui nous a donné les meilleurs résultats. Si l'on effectue la désacétylation selon la méthode de ZEMPLEN ou avec l'ammoniac, les rendements sont faibles.


CH2OH
HO
O
OH
CH
CH
Ac2O
CH2O-Ac
Ac-O
O
O-Ac
O-Ac
O-Ac
(XXXIV)
PhOH
CH2O-Ac
Ac-O
O
O-Ph
O-Ac
O-Ac
MeONa
NH3
CH2OH
HO
O
O-Ph
CH
CH
(XXXV)
(XXXVI)

SYNTHESE DU PHENYL-β-D-GALACTOSIDE 4,6 PHOSPHATE CYCLIQUE

L'emploi du dichlorophényl phosphate permet d'atteindre assez facilement les esters phosphoriques cycliques de composés polyhydroxylés (33,73,74,75) . En particulier, les méthyl et phényl glucosides 4,6-(phényl phosphate) avaient été préparés (31) à l'aide de ce réactif sans protéger les groupes hydroxyles en 2 et 3 pendant la réaction. Faisant réagir cet agent phosphorylant sur le phényl-β-D-galactoside (XXXVI), nous avons pu isoler un corps cristallin dont l'analyse concordait parfaitement avec celle d'un phényl hexoside(phényl phosphate) Nous lui avons assigné, par analogie avec les exemples cités, la formule du phényl-β-D-galactoside-4,6-(phényl phosphate) (XXXVII).

Comme dans le cas du phényl glucoside 4,6-(phényl phosphate) l'hydrogènolyse ne peut être employée pour enlever le groupe phényle lié au phosphate : aussi l'avons nous éliminé sélectivement par un traitement alcalin ménagé, et nous avons obtenu le phényl-β-D-galactoside 4,6-phosphate (XXXVIII) isolé ensuite sous forme de sel de cyclohexylammonium. Ce composé a été caractérisé, outre l'analyse élémentaire, par un titrage potentiométrique démontrant une seule dissociation acide et par un titrage périodique confirmant la présence d'un seul groupe α-diol.

Pendant le traitement alcalin du phényl-β-D-galactoside-4,6-(phényl phosphate) il apparaît à côté du diester des monoesters phosphoriques du phényl galactoside. Mais si dans le cas du phényl glucoside, le phosphate cyclique et les monophosphates ne peuvent être séparés que par chromatographie sur colonne de papier, ici, une cristallisation permet aussi la séparation des dérivés du phényl galactoside. La fraction des monoesters de l'acide phosphorique a été caractérisée par les méthodes habituelles : analyse et titrage potentiométrique. Un titrage périodique révélait que le mélange des monophosphates ne con-

sommait qu'un quart d'équivalent de périodate, ce qui met en évidence la présence du phényl galactoside 3 phosphate, (XL) car lui seul parmi les monophosphates du phényl galactopyranoside, ne possédant pas de système α-diol, ne consomme pas de periodate.

Il a été très difficile de déterminer quels étaient les autres monophosphates du phényl galactoside présents dans le mélange. Les méthodes d'analyse par chromatographie sur résine échangeuse d'ions que nous avions utilisées dans les cas des monophosphates des phényl et méthyl glucosides n'ont pas permis de distinguer ceux du phényl-β-D-galactosides.

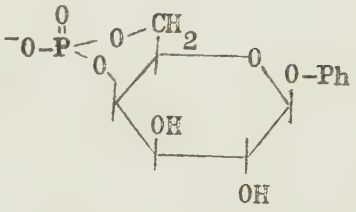
Sur la colonne de Dowex 2 x 10 en forme de monochloracétate avec laquelle nous avions séparé les phényl-β-D-galactosides 4,et 6 phosphate provenant de l'hydrolyse du phényl galactoside 4,6-phosphate cyclique, nous nous sommes aperçu que le phényl-β-D-galactoside 6 phosphate n'existait pas dans le mélange, mais nous n'avons pas pu identifier les autres monophosphates quelle qu'ait été la taille de la colonne.

Sur colonne de Dowex 1 x2 en forme borate, nous avions rencontré la même difficulté.

Par un titrage periodique, nous sommes parvenu à déterminer quels étaient les constituants du mélange. En effet, nous savions que ces monophosphates ne consommaient qu'un quart d'équivalent de periodate ; les deux monophosphates du phényl galactopyranoside oxydables par le périodate sont les 2 et 4 phosphates. Nous avions auparavant observé que leur vitesse d'oxydation étaient très différentes. Nous avons pris alors 1/4 de mole de chacun de ces sucres, nous les avons oxydés par du periodate et comparé l'allure des courbes obtenues à celle de l'oxydation périodique des monophosphates.

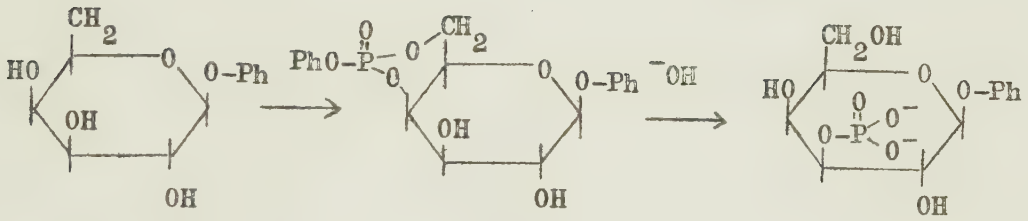
Nous avons constaté que cette dernière était identique à celle

du phényl galactoside 4 phosphate (XXXIX).



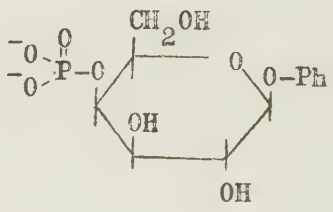
(XXXVIII)

+



(XXXVI) (XXXVII) (XL)

+



(XXXIX)

Avec les modèles moléculaires, on constate que le cycle (le-3, 4-phosphate cyclique des glycosides) intermédiaire dans la formation des monophosphates est plus facile à bâtir sur le galactoside que sur le glucoside. Les directions des liaisons entre les cinq atomes de ce cycle doit être sensiblement dans un même plan. Aussi pour former le glucoside-3,4-phosphate cyclique, il faut par torsion sur la molécule de sucre amener les deux hydroxyles équatoriaux en 3 et 4 à être presque coplanaires. Ceci a pour résultat d'aplanir la forme chaise

du glucopyranoside et de donner à l'ensemble du phosphate de sucre une certaine rigidité. Dans le galactoside, les deux hydroxyles en 4 et 3, l'un axial, l'autre équatorial sont en cis et favorisent la confortion chaise du galactopyranoside laissant à la molécule une certaine mobilité.

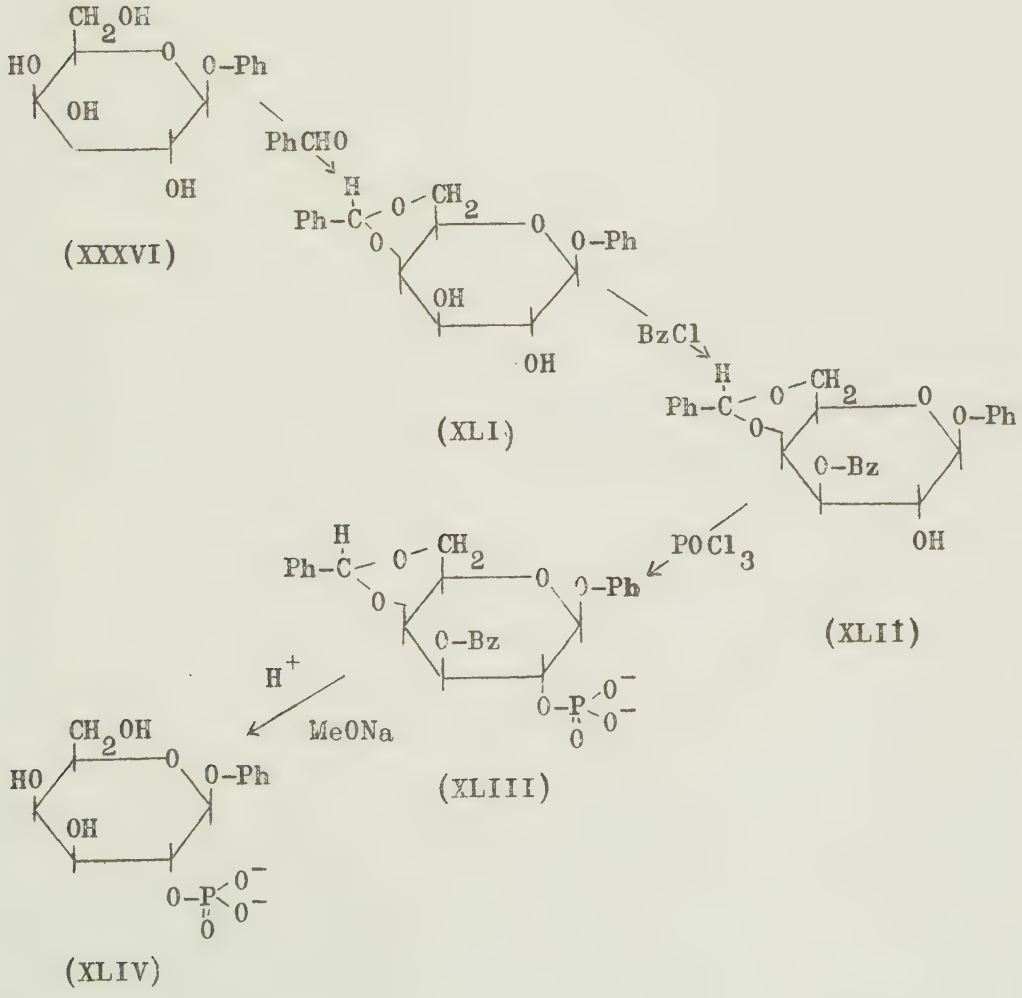
SYNTHESE DU PHENYL-β-D-GALACTOSIDE-2-PHOSPHATE

Pour la synthèse de ce composé, il faut avant la phosphorylation bloquer les groupes hydroxyles des carbones 3,4 et 6 du phényl galactoside (XXXVI). Le blocage de ceux en 4 et 6 est aisé ; il suffit de condenser une mole de sucre avec une mole de benzaldéhyde pour obtenir le phényl-4,6-benzylidène-β-D-galactoside (XLI). Toutefois, nous avons dû utiliser comme solvant de purification le dioxanne, plutôt que l'éthanol préconisé par MAC CLOSKEY et COLEMAN (64), car le corps y est assez insoluble et pour recristalliser des quantités de l'ordre de 100 g., il aurait fallu employer trop de solvant.

Nous avions démontré que le phényl-4,6-benzylidène-β-D-glucoside réagit avec une mole de chlorure de benzoyle pour donner un mélange contenant, à côté de la matière première, un monobenzoylphényl glucoside. Nous nous attendions à trouver un mélange analogue quand nous avons appliqué cette réaction au benzylidène phényl galactoside pour protéger un des deux groupes hydroxyles libres. Il en fut tout autrement. Quand on fait réagir un équivalent de chlorure de benzoyle avec le phényl benzylidène galactoside et que l'on sépare les produits de réaction par chromatographie sur alumine, on constate l'absence totale du dérivé dibenzoylé ; le mélange contient à côté de la substance de départ, uniquement un monobenzoate (XLII) qui a été caractérisé par son analyse élémentaire et par une forte bande d'absorption dans l'infra-rouge à 3600^{-1} due à fréquence OH.

Nous avons pensé que, par analogie avec la benzoylation du benzylidène-phényl glucoside, le chlorure de benzoyle avait réagi sur l'hydroxyle en 3. Nous avons eu confirmation de cette hypothèse après avoir phosphorylé le monobenzoate (XLII) avec de l'oxychlorure de phosphore pour obtenir l'ester phosphorique (XLIII) et éliminé le groupe benzylidène

par une hydrolyse et le groupe benzoyle par la méthode de Zemplen. Nous avons alors pu cristalliser le sel de cyclohexylamine d'un monophosphate du phényl-β-D-galactoside (XLIV). Lors de l'oxydation avec du periodate de sodium, ce corps consommait rapidement un équivalent de réactif comme seuls pouvaient le faire le phényl-β-D-galactoside 4-phosphate et le phényl-β-D-galactoside-2-phosphate. Or pendant la phosphorylation la position 4 du glycoside était occupée ; c'est donc sur le carbone 2 que l'oxychlorure de phosphore a réagi et par conséquent, c'est sur le carbone 3 que s'est effectuée la monobenzoylation.



Il n'est cependant pas imposible que l'attaque du groupe benzoyle se soit faite sur le carbone 2 pendant la monobenzoylation du phényl 4,6-benzylidène-β-D-galactoside. Au cours de la séparation sur alumine qui est toujours un peu basique, le radical benzoyle aurait alors migré du carbone 2 vers la carbone 3. Il est peu vraisemblable toutefois que cette migration ait pu être totale et si elle avait été partielle, nous aurions retrouvé les deux isomères ; de plus dans le cas des monobenzoates du-4,6-benzylidène méthyl glucoside (66) qui ont été séparés également sur alumine, une telle migration n'a jamais été observée, et par conséquent, elle ne semble pas devoir être envisagée.

Le fait remarquable dans cette benzoylation est l'absence de dérivé dibenzoylé. Le phényl 4,6-benzylidène-β-D-glucoside traité dans les mêmes conditions fournissait une majorité de dérivé dibenzoylé. Il semble que la rigidité du cycle entre en jeu dans cette réaction. En effet, dans le phényl-4,6-benzylidène-β-D-glucoside, le cycle pyranoïde est rigide puisque le groupe benzylidène est fusionné en trans sur le sucre. Il n'en est pas de même dans le cas du phényl 4,6-benzylidène-β-D-galactoside où le benzylidène lié en cis sur le sucre laisse le cycle pyranoïde assez mobile, permettant un changement dans la forme de la molécule qui réduirait l'activité du groupe hydroxyle en 2.

SYNTHESE DU PHENYL-β-D-GALACTOSIDE 3 PHOSPHATE

En traitant le phényl 4,6-benzylidène-β-D-glucoside par le dichlorophényl phosphate, nous avions pu isoler le phényl 4,6-benzylidène-β-D-glucoside-2,3-(phényl phosphate)cyclique. La configuration des hydroxyles en 2 et 3 étant la même dans le glucose et le galactose, il était à prévoir qu'en faisant réagir le dichlorophényl phosphate sur le phényl-4,6-benzylidène-β-D-galactoside (XLI), on obtiendrait le 2,3-(phényl phosphate) correspondant (XLV). Les résultats obtenus confirmèrent cette hypothèse. Cependant si dans le cas du-4,6-benzylidène phényl glucoside, il avait été très difficile de purifier le triester phosphorique, ici, par simple cristallisation, nous avons pu recueillir un composé dont l'analyse élémentaire donnait les taux escomptés pour le corps cherché. De plus, en contact avec une résine acide ses solutions restaient neutres ; l'acide phosphorique avait donc bien ses trois fonctions estérifiées

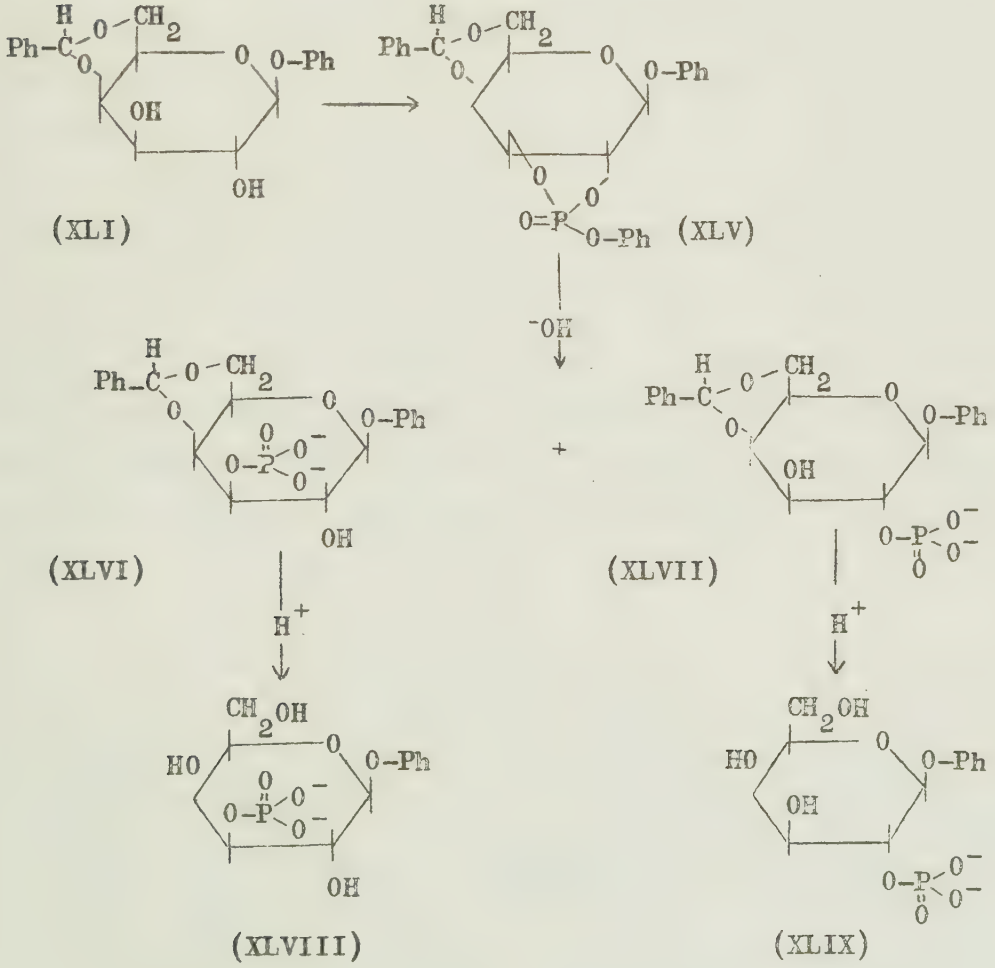
La facilité avec laquelle le-2,3-(phényl phosphate) du benzylidène phényl galactoside est formé et purifié met, une fois de plus, en évidence la différence de comportement des-4,6-benzylidène glucosides et galactosides. Comme nous l'avons déjà dit, cette différence s'explique par la rigidité du dérivé du glucose en opposition avec la mobilité du galactoside. La tension interne des phosphates cycliques à cinq chaînons, démontrée par WESTHEIMER et ses collègues(44) se trouve augmentée dans le cas des glucosides et diminuée dans le cas des galactosides et par là, favorise la stabilité relative des derniers.

On sait que les phosphates cycliques à cinq chaînons sont rapidement hydrolysés en milieu alcalin (46). Par ailleurs KHORANA et MOFFATT (33) ont démontré que dans les mêmes conditions les phényl phosphates cycliques perdent facilement le groupe phényle. En conséquence,

en traitant le benzylidène galactoside-2,3-(phényl phosphate) (XLV) avec une base, non seulement le groupe phényle lié au phosphate s'éliminerait, mais encore se produirait la rupture du cycle avec la formation simultanée de deux monophosphates, à savoir : les phényl-4,6-benzylidène-β-D-galactosides2-(XLVII) et -3-phosphate (XLVI). Comme les hydroxyles en 4 et 6 sont bloqués, une transestérification intramoléculaire et l'apparition de monophosphates autres que ceux prévus n'étaient pas à craindre. Nous avons donc soumis le phényl-4,6-benzylidène-β-D-galactoside-2,3- (phényl phosphate) à un traitement alcalin et après une purification appropriée , nous avons cristallisé le sel de cyclohexylamine d'un phényl-4,6-benzylidène galactoside monophosphate, caractérisé par analyse élémentaire et titrage potentiométrique . Comme nous savions par nos expériences de benzoylation que le groupe hydroxyle en 3 était plus réactif que celui en 2, il nous paraissait probable que le composé isolé était le phényl-4,6-benzylidène-β-D-galactoside-3-phosphate (XLVI) plutôt que le -2-phosphate (XLVII), son isomère. Nous avons alors éliminé le groupe benzylidène par une hydrolyse acide, en nous servant de l'acidité propre du phosphate, puis nous avons comparé par chromatographie le produit de la réaction avec du phényl galactoside-2-phosphate authentique. La substance provenant de l'hydrolyse, tout en migrant dans la région où on retrouve les monophosphates du phényl galactoside a un Rf différent de celui du phényl galactoside-2-phosphate, mais voisin de celui du 4 phosphate. Dans les réactions que nous avons suivies pour cette synthèse la formation du 4 phosphate n'était pas exclue puisque nous avons traité en milieu acide le phényl-4,6-benzylidène galactoside monophosphate. Dans ces conditions, il aurait pu y avoir migration du phosphate vers le carbone 4 au fur et à mesure de l'élimination du groupe benzylidène. Cependant le sel de cyclohexylamine cristallin du phényl galactoside monophosphate

ne consommait pas de periodate lors d'un essai de titrage avec ce réactif, or parmi les monophosphates du phényl galactopyranoside, le phényl galactoside-3-phosphate ne possède pas de système α-diol et par conséquent ne peut pas consommer de periodate. Donc le composé était le phényl-β-D-galactoside-3-phosphate(XLVIII).

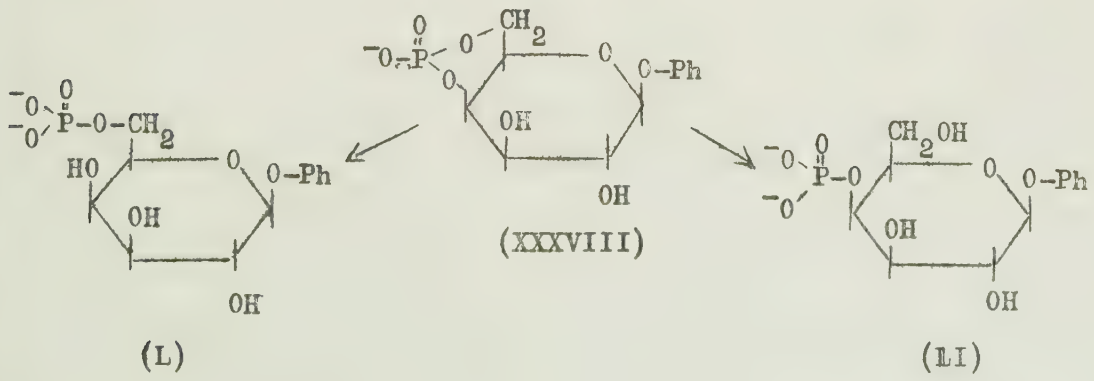
Les eaux-mères de cristallisation du benzylidène phényl galactoside-3-phosphate ont été à leur tour hydrolysées en milieu acide ; par la chromatographie, nous avons alors pu y mettre en évidence la présence du phényl-β-D-galactoside-2-phosphate (XLIX).



SYNTHESE DES PHENYL GALACTOSIDES-4-ET-6-PHOSPHATE PAR HYDROLYSE ALCALINE DU PHENYL-β-D-GALACTOSIDE-4,6-PHOSPHATE CYCLIQUE

Ces deux monophosphates nous paraissaient d'un accès facile. Nous savions en effet que le cycle phophorylé formé sur les carbones -4-et-6-des méthyl et phényl glucosides subissait une rupture en milieu alcalin à chaud pour donner un mélange de glucosides-4-et-6-phosphate.

Cependant les monophosphates du phényl galactoside étant moins stables en milieu alcalin que les dérivés correspondants du glucose, il n'est pas possible de transformer quantitativement tout le phényl galactoside-4,6-phosphate (XXXVIII)présent sans hydrolyser une quantité appréciable des monophosphates formés ; et comme la vitesse d'hydrolyse des deux monophosphates n'est pas nécessairement la même, pour déterminer le rapport des produits, il nous fallait interrompre l'hydrolyse dès l'apparition du phosphate inorganique. Ce dernier inconvénient et la tendance des monophosphates du phényl galactoside à syncristalliser, (contrairement à ce qui se passe dans le cas des dérivés correspondants du glucose)ont rendu la préparation des phényl galactosides-4-et-6-phosphate(LI et L) moins aisée que prévu, nous obligeant à recourir à une séparation sur colonne Chromax des produits formés.



(L) (XXXVIII) (LI)

Nous avons d'abord analysé ces deux corps et déterminé par un titrage potentiométrique qu'ils étaient bien des monoesters de l'acide phosphorique. Puis par un titrage avec du periodate de sodium, nous avons établi leur structure. Le phényl-β-D-galactoside-4-phosphate consomme assez lentement un équivalent de periodate . Le phényl-β-D-galactoside-6-phosphate en consomme très rapidement deux. Ces résultats sont en accord avec ceux prévus puisque le phényl-β-D-galactoside-4-phosphate ne possède qu'un système α-diol et que son isomère le-6-phosphate en possède deux.

Par chromatographie élutive sur papier (voir Méthodes Générales) nous avons pu établir que pendant l'hydrolyse du phényl-β-D-galactoside-4,6-phosphate, il se forme deux à trois fois plus de phényl-β-D-galactoside 4 phosphate que de phényl-β-D-galactoside-6-phosphate. Nous avons eu confirmation de ce résultat en chromatographiant sur résine échangeuse d'ions sous forme de monochloracétate le mélange réactionnel. Dans l'hydrolyse du phényl-β-D-glucoside-4,6-phosphate cyclique, les phényl glucosides-4-et-6-phosphate apparaissent dans les mêmes proportions. Après les hydrolyses des méthyl glucoside et galactoside et des phényl glucoside et galactoside-4,6-phosphate cyclique, on peut conclure que dans le rapport entre les quantités de monophosphates formés, seul le groupe aglycone a une influence et non la configuration du glycoside sur lequel est fixé le cycle phosphorylé.

CHAPITRE III

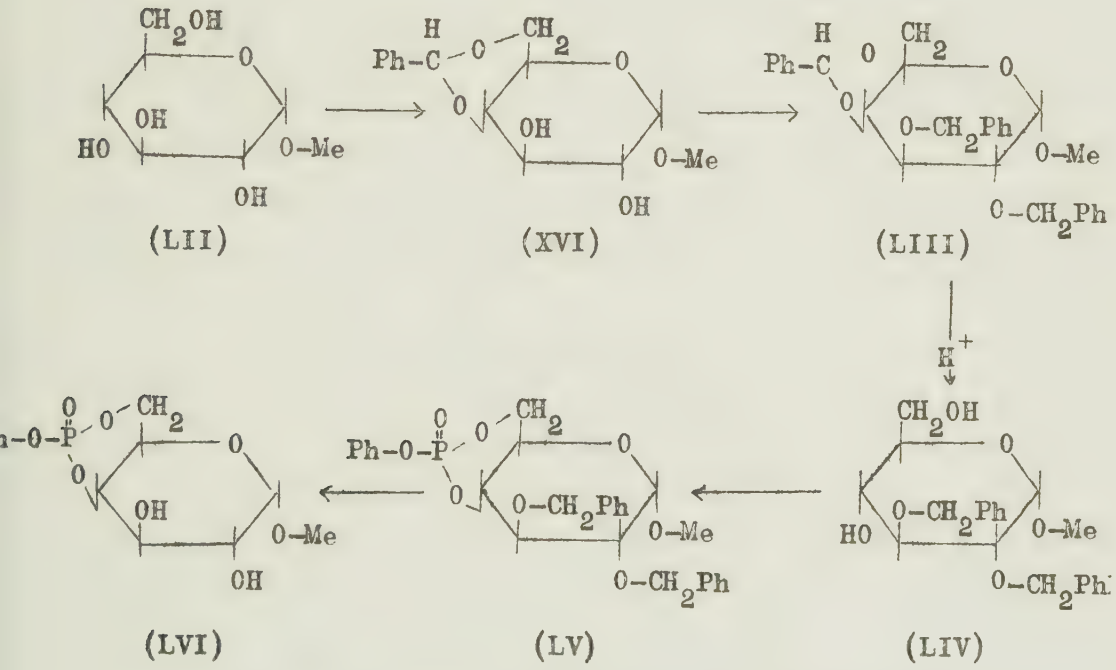
COMPORTEMENT DU METHYL-α-D-GLUCOSIDE-4,6-(PHENYL PHOSPHATE) EN MILIEU ALCALIN.

Nous avons vu dans les chapitres précédents (I et II) que pendant l'hydrolyse alcaline des phényl glycosides-4,6-(phényl phosphate) il se produit une transestérification intramoléculaire aboutissant à la formation de phényl glycosides-3-et-4-phosphate. Nous avons aussi démontré que le groupe aglycone influait sur les proportions relatives des produits formés lors de l'hydrolyse des phényl et méthyl glycosides-4,6-(hydrogène phosphates). Il était dès lors non dépourvu d'intérêt d'examiner le comportement du méthyl-α-D-glucoside-4,6-(phényl phosphate)en milieu alcalin pour établir si le groupe aglycone intervenait ou non dans la transestérification intramoléculaire que nous nous attendions à observer, par analogie avec l'hydrolyse du phényl glucoside-4,6-(phényl phosphate). Ce travail était facilité puisqu'une méthode d'analyse de tous les monophosphates du méthyl-α-D-glucoside était déjà élaborée et pouvait être appliquée directement à la fraction des monophosphates obtenus.

En faisant réagir le dichlorophényl phosphate sur le méthyl-α-D-glucoside non protégé, BADDILEY et ses collègues (31) ont obtenu le méthyl-α-D-glucoside-4,6-(phényl phosphate) avec un très faible rendement. Pour l'améliorer, nous avons mis au point une synthèse en plusieurs étapes donnant chacune avec de bons rendements des intermédiaires facilement cristallisables.

On commence par bloquer les hydroxyles en 4 et 6 du méthyl-α-D-glucoside (LII) par le groupe benzylidène (XVI) (65), puis en

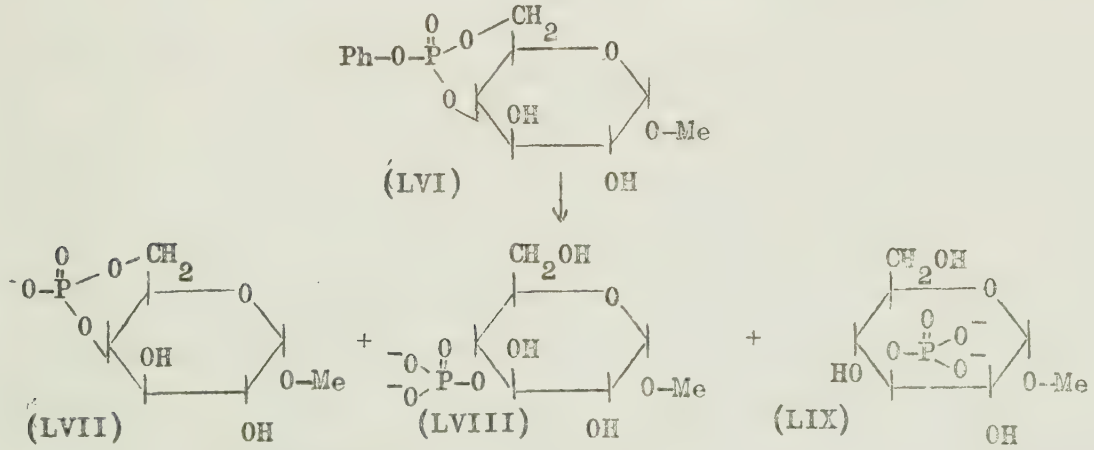
faisant réagir sur ceux en 2 et 3 le chlorure de benzyle en présence de potasse selon la méthode de DENNYSON et GILVRAIN (78), on obtient le méthyl-4,6-benzylidène-2,3-dibenzyl-α-D-glucoside (LIII). Il suffit ensuite de libérer par hydrolyse acide les hydroxyles en 4 et 6 (LIV) et de phosphoryler le méthyl 2,3 dibenzyl-α-D-glucoside obtenu par le dichlorophényl phosphate pour avoir le méthyl-2,3-dibenzyl-α-D-glucoside-4,6-(phényl phosphate) (LV). Par hydrogénolyse catalytique sur palladium en milieu neutre, on élimine ensuite les radicaux benzyles et recueille très facilement par cristallisation le méthyl-α-D-glucoside-4,6-(phényl phosphate) (LVI).



Ce dernier traité par de l'hydroxyde de potassium suivant la méthode de KHORANA et MOFFATT (33) fournit à côté du méthyl-α-D-glucoside-4,6-phosphate(LVII), des monophosphates du méthyl-α-D-glucoside. Ceux ci pouvant provenir de l'hydrolyse du diester, nous avons traité le méthyl-α-D-glucoside-4,6-phosphate

dans les conditions alcalines utilisées pour hydrolyser le triester cyclique et constaté par chromatographie qu'aucune réaction ne s'était produite.

Le méthyl-α-D-glucoside-4,6-phosphate (LVII) est le produit principal de cette hydrolyse, cependant la présence des monophosphates empêche de l'isoler entièrement par cristallisation et sa concentration reste telle dans les eaux-mères qu'il est pratiquement impossible d'y analyser la nature des monophosphates par analyse sur résine échangeuse d'ions, car leur position d'élution se trouve déplacée. Après avoir éliminé par cristallisation le plus possible de phosphate cyclique, nous avons isolé les monophosphates du phosphate cyclique restant, par chromatographie sur colonne Chromax. Nous avons ensuite établi la nature de ces monophosphates par analyse sur résine Dowex 1 x2 en forme borate et nous avons trouvé que ce mélange était constitué pour la plus grande partie de méthyl-α-D-glucoside 2 phosphate (LIX) et d'un peu de méthyl-α-D-glucoside-4-phosphate (LVIII).



Ces résultats étaient analogues à ceux obtenus dans le cas des phényl-β-D-glucoside et galactoside-4,6-(phényl phosphate) prouvant que la nature du groupe aglycone du glycoside n'a pas d'influence sur cette réaction.

CHAPITRE IV

SYNTHESE ET PREUVE DE LA STRUCTURE DU METHYL-α-D-GLUCOSIDE 6 (PHENYL PHOSPHATE)

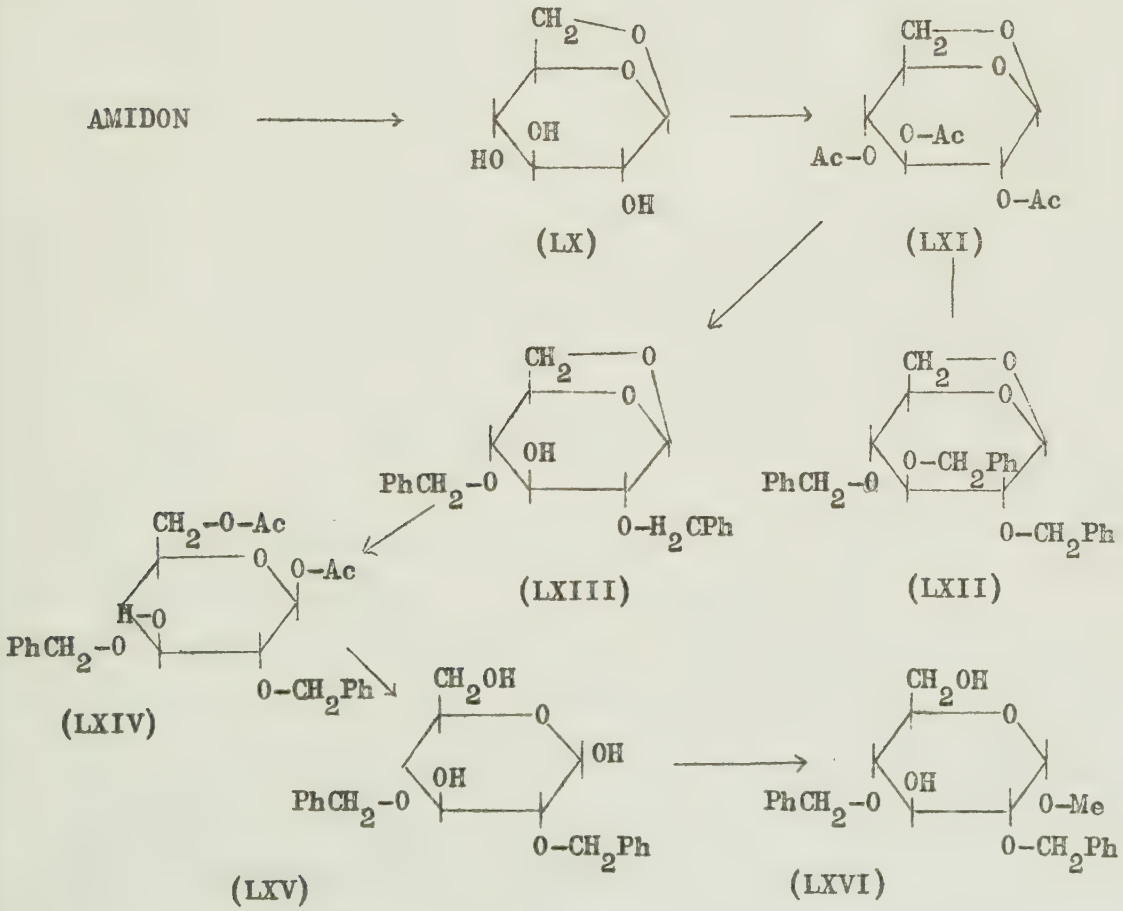
Nous avons démontré dans le chapitre III que, lors du traitement alcalin du méthyl-α-D-glucoside-4,6-(phényl phosphate) pour effectuer l'hydrolyse sélective du groupe phényle lié au radical phosphoryle, il se forme à côté du phosphate cyclique, une certaine quantité de monophosphates. Si après avoir éliminé la majorité du méthyl glucoside-4,6-phosphate par cristallisation, on effectue une analyse du mélange résiduel sur résine Dowex 1 x 2, on trouve sortant un peu avant le-4,6-phosphate, un autre phosphate de sucre. Celui-ci, à cause de sa position d'élution a été identifié comme un phosphate cyclique et comme la fraction des monophosphates contenait à coup sûr du méthyl glucoside-3-phosphate (consommation de periodate inférieure à une mole par mole de sucre), nous avons tout d'abord pensé qu'il s'agissait du méthyl-α-D-glucoside-3,6-(hydrogène phosphate), considéré comme précurseur possible du méthyl glucoside 3 phosphate. La synthèse du méthyl glucoside-3,6-phosphate nous aurait permis non seulement d'identifier avec certitude le phosphate cyclique inconnu, mais encore d'étudier la formation et l'hydrolyse d'un phosphate cyclique à sept chaînons attaché au noyau d'un sucre en forme pyranoïde. De tels phosphates cycliques ont été postulés par plusieurs auteurs, mais des réserves concernant leur structure ont été également avancées. (59,79,80).

Pour la synthèse du méthyl-α-D-glucoside-3,6-(hydrogène

phosphate), il nous fallait disposer d'un dérivé du méthyl glucopyranoside dont les hydroxyles en 2 et 4 étaient bloqués. Comme par ailleurs il était à prévoir que ce cycle hépta-atomique serait peu stable (tensions sur modèles moléculaires), les groupes protecteurs devaient pouvoir être enlevés en milieu neutre. Le méthyl-2,4-di-O-benzyl-α-D-glucoside correspond à ces conditions : nous en avons donc entrepris la synthèse.

On commence par préparer le 1,6-anhydro-glucopyranose par pyrolyse de l'amidon de blé selon la méthode de GERECS et ZEMPLEN (81) (LX). Cependant nos rendements étaient inférieurs à ceux de ces auteurs, car à côté du lévoglucosane, apparaît une grande quantité de produits résineux qui empêchent la cristallisation du produit. Nous avons donc été contraint de pyrolyser une grande quantité d'amidon (environ 12 kg) pour obtenir 1500 g. de lévoglucosane, que nous avons transformé en-2,3,4-triacétyl lévoglucosane (LXI). En faisant agir sur ce composé le chlorure de benzyle en présence d'une base, ZEMPLEN, CSÜROS et ANGYAL (55) ont obtenu un mélange de-2,3,4-tribenzyl lévoglucosane (LXII) et de-2,4-dibenzyl lévoglucosane (LXIII). Malheureusement le dérivé dibenzylé n'est formé qu'en petite quantité à côté de 70-80 % du tribenzyléther. Par cristallisation le tribenzyléther est séparé du dibenzyléther ; mais si ce dernier doit être très pur, les auteurs hongrois préconisent de repasser au dibenzyl-3-acétyl lévoglucosane. Nous avons trouvé qu'il suffit de recristalliser le 2,4-dibenzyl lévoglucosane dans un mélange éther-pentane, pour obtenir un produit d'une extrême pureté. Celui ci fut alors soumis à une acétolyse (55) pour donner le-2,4-di-O-benzyl-1,6- di-O-acétyl-β-D-glucose (LXIV) qui après une désacétylation selon la méthode de ZEMPLEN, nous a fournis le-2,4-di-O-benzyl-β-D-glucose (LXV).

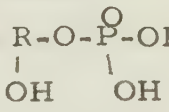
On sait (86) que 0,25 % d'acide chlorhydrique dans du méthanol sec suffit pour catalyser la conversion du glucose en α-méthyl glucoside ; bien que les esters benzyliques puissent être scindés en milieu acide, la quantité minime d'acide présent dans le milieu réactionnel ne nous a pas fait craindre une scission trop importante. En effet par cette méthode, nous avons obtenu le méthyl-2,4-di-O-benzyl-α-D-glucoside (LXVI) avec un rendement excellent à partir du sucre libre. La structure en a été prouvée par une hydrogénolyse des groupes benzyles conduisant au méthyl-α-D-glucoside identifié par co-chromatographie, et par son point de fusion mélangé avec le dérivé authentique.



Nous avions donc le produit de départ pour la synthèse du méthyl-α-D-glucopyranoside-3,6-phosphate.

Aucun cycle phosphorylé à sept chaînons n'avait été signalé avant les travaux de KHORANA et al. (34). ZEILE et KRUCKENBERG (80) avaient cru isoler un tel cycle en traitant le méthyl-α-D-glucoside par le monoaniline phosphorodichloridate, mais BADDILEY et al. (31) ont suggéré par la suite que ce cycle n'avait en fait que six chaînons. E. FISCHER (59) avait isolé un cycle phosphorylé du 7-β-D-glucosyl-théophylline par action de l'oxychlorure de phosphore sur cette purine du glucoside, mais il en ignorait la structure. Ce n'est qu'en 1951 que KENNER avança l'hypothèse que les positions 3 et 6 du glucoside étaient estérifiées et donc que ce cycle comportait sept chaînons.

KHORANA (33) et BADDILEY (73) avaient mentionné que, par transestérification en milieu alcalin, des composés du type



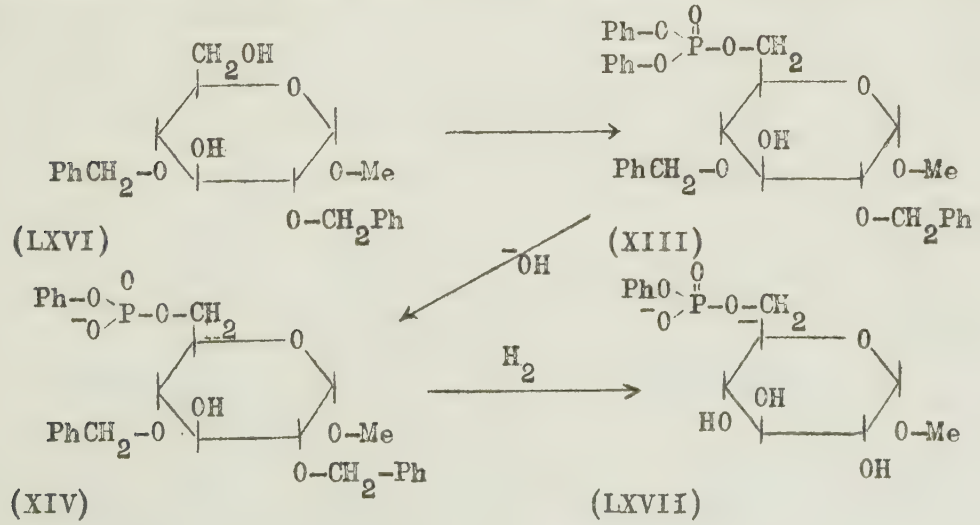
se transformaient en composés cycliques à cinq ou six chaînons, mais là non plus, aucun cycle à sept chaînons ne fut trouvé.

Le premier cycle phosphorylé heptatomique synthétisé avec certitude fut le butane-1,4-diol phosphate cyclique. Sa synthèse se faisait en traitant le 4 hydroxybutyl phosphate par du dicyclohexyl-carbodiïmide (DCC) (34). Par suite on a découvert que le 1,2 isopropylidène glucose-5-nitrate 6-diphényl phosphate fournissait par traitement alcalin le 1,2 isopropylidène glucose 5 nitrate-3,6-phosphate (35).

Appliquant ce même principe, nous avons d'abords synthétisé le méthyl 2,4-di-O-benzyl-α-D-glucoside 6-(diphényl phosphate) en faisant agir sur le glucoside le diphényl chlorophosphate. Nous avons obtenu une huile neutre (XIII) qui traitée par de la potasse a permis d'isoler ensuite le sel de cyclohexylamine cristallin d'un diester de l'acide phosphorique ; ceci était prouvé par le titrage potentiométri-

que qui ne révélait qu'une seule dissociation acide. Cependant l'analyse élémentaire indiquait qu'il ne s'agissait pas du dibenzyl méthyl glucoside-3,6-phosphate, mais d'un autre corps, dont nous avons pu démontrer qu'il était le méthyl-2,4-di-O-benzyl-α-D-glucoside-6-(phényl hydrogène phosphate) (XIV). En effet après avoir éliminé les groupes benzyles par hydrogénolyse en milieu neutre, nous avons pu isoler une substance cristalline qui bien que migrant sur des chromatogrammes dans une région similaire à celle du méthyl glucoside-4,6 phosphate consommait deux équivalents de périodate et de ce fait ne pouvait pas être un phosphate cyclique du méthyl glucoside. Il s'agissait en effet du méthyl-α-D-glucoside-6-(phényl hydrogène phosphate) (LXVII) identifié non seulement par analyse élémentaire, mais aussi par la présence du groupe phényle confirmée par spectrométrie en ultra-violet.

Nous avons alors repris et analysé aux rayons infra-rouges la substance isolée après traitement alcalin du produit de la phosphorylation du méthyl 2,4 dibenzyl-α-D-glucoside pour contrôler si la cyclisation avait eu lieu ou non. Nous avons retrouvé la fréquence OH prouvant que l'hydroxyle en 3 n'avait pas été atteint par le phosphate.

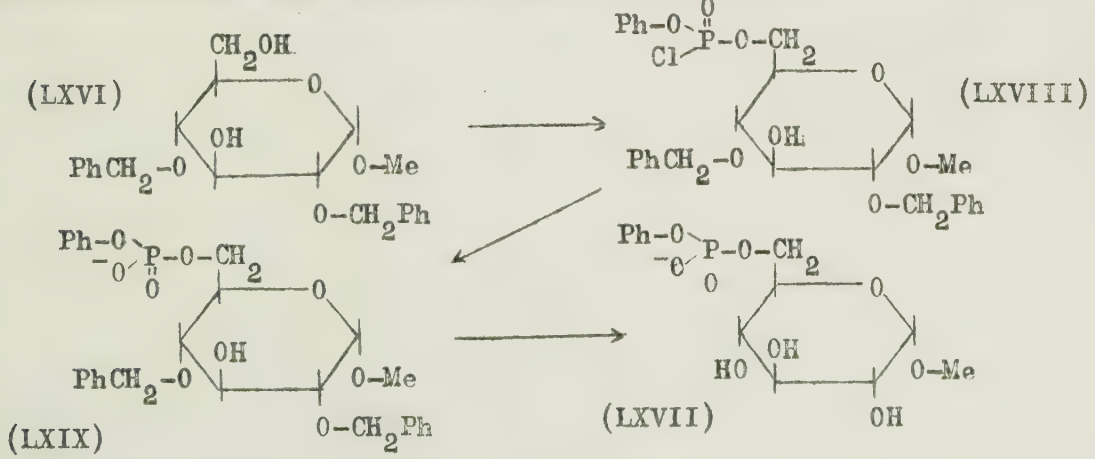


Si la cyclisation n'avait pas pu se faire par transestérification il nous restait la possibilité de créer un tel cycle en attaquant le méthyl 2,4-dibenzyl-α-D-glucoside par un agent phosphorylant bi-fonctionnel tel le dichlorophényl phosphate (73 , 74,75,31).

Après réaction du dichlorophényl phosphate sur le méthyl 2,4 dibenzyl-α-D-glucoside, nous avons dissous le produit obtenu dans du chloroforme et nous nous sommes aperçu qu'en ajoutant un peu d'eau la solution devenait acide. Deux possibilités étaient à envisager: la première, que le cycle était formé et que au contact de l'eau le triester de l'acide phosphorique s'était hydrolysé par perte du groupe phényle. (Ce phénomène avait déjà été constaté dans le cas du 1,2 isopropylidène 3 méthyl glucose (83) traité dans ces conditions), ou bien encore que le cycle lui-même s'était hydrolysé ; la seconde et la plus probable était que seule une fonction du dichlorophényl phosphate avait réagi et que l'autre avait été hydrolysée par l'addition de l'eau (LXVIII,LXIX).

Nous avons alors recueilli le sel de cyclohexylamine du produit et après hydrogénolyse des groupes benzyles, nous l'avons identifié comme étant le méthyl-α-D-glucoside-6-phényl phosphate (LXVII).

Nous n'avons pas pu obtenir le produit cyclique en essayant de prolonger le temps de la réaction ou encore en chauffant le mélange réactionnel : le temps de réaction n'influait en rien sur les résultats obtenus et par chauffage le produit se décomposait.

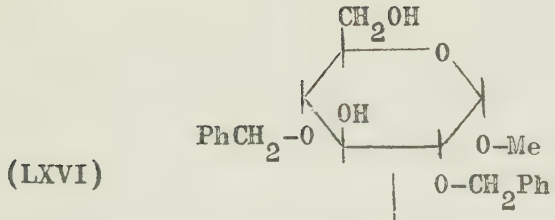


Il ne nous restait plus alors qu'à essayer de former ce cycle avec un agent phosphorylant beaucoup plus réactif que ceux employés auparavant. L'oxychlorure de phosphore avait déjà été employé pour synthétiser des phosphates cycliques de glucides et comme le méthyl 2,4 dibenzyl-α-D-glucoside est insoluble dans l'eau, un simple lavage à l'eau pouvait débarrasser son ester phosphorique des impuretés apparues dans sa phosphorylation par l'oxychlorure de phosphore.

Après la phosphorylation avec ce réactif (LXX) et l'élimination des groupes benzyles, nous avons étudié par chromatographie les produits de la réaction.

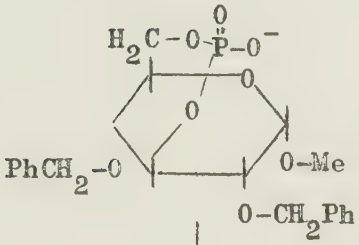
Sur un chromatogramme apparaissaient deux taches ; l'une très forte, de même Rf que le méthyl-α-D-glucoside-4,6-phosphate cyclique (LVIII) et l'autre plus faible d'un Rf un peu plus bas et qui doit être le corps que nous cherchions(LXXII).

Ainsi nous pensons avoir bien formé le méthyl-α-D-glucoside -3,6-phosphate cyclique, mais il se peut que, pendant l'hydrogénolyse des groupes benzyles il se produise un rétrécissement du cycle et l'apparition du méthyl-α-D-glucoside-4,6-phosphate. Ces travaux étaient menés en même temps que ceux faits pour établir quels étaient les monophosphates formés pendant le traitement alcalin des glycosides 4,6 phosphate cyclique. Nous avons trouvé par la suite que les monophosphates étaient formés exclusivement de glycosides-4-et-3-phosphate. Le cycle intermédiaire ne pouvait être alors que le-4,3-phosphate cyclique et c'est lui qui devait s'éluer avant le-4,6-phosphate cyclique sur colonne de Dowex 1 x 2.



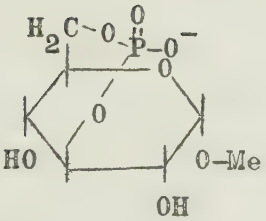
(LXVI)

$POCl_3$

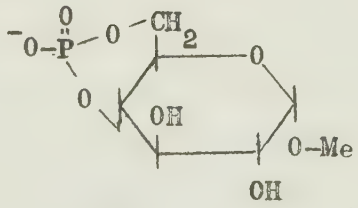


(LXX)

H_2



(LXXI)



(LVII)

CHAPITRE V

IDENTIFICATION DES PHOSPHATES DES GLYCOSIDES SUR COLONNE D'ECHANGEURS D'IONS

La chromatographie sur résines échangeuses d'ions s'avère la technique la plus sûre et la plus élégante pour identifier les phosphates d'un sucre (84). En effet il suffit d'étalonner une colonne en déterminant séparément la position d'élution des phosphates d'un sucre donné synthétisés d'une manière sans équivoque ; puis dans les mêmes conditions, on élue de la même colonne un seul ou un mélange de monophosphates de ce sucre, formés au cours d'une réaction. On peut ainsi en comparant les positions d'élution obtenues à celles établies précédemment identifier et préciser la structure du phosphate de sucre ou caractériser quels sont les constituants du mélange.

Les méthyl-α-D-glucosides-6,4,3 et 2-phosphate avaient déjà été séparés dans cet ordre, sur une résine Dowex 1 x 2 en forme de borate avec comme éluant, une solution de tétraborate de potassium 0,062 M; l'ion borate qui, dans certains cas forme les complexes avec les sucres, sert à augmenter l'acidité du glucide phosphorylé(36). Il ressort de ces travaux que les méthyl glucosides-4 et-6-phosphate ne sont pas ou que peu compléxés par l'ion borate : en effet leur pouvoir rotatoire ne varie pas en présence de borate(36) et ce n'est que leur différence d'acidité intrinsèque qui permet de les distinguer. Mais un complexe de borate incorporant les groupes hydroxyles en 4 et 6 est possible(36) et partant, l'acidité des méthyl glucosides-2 et3 phosphate se trouve modifiée et différentiée.

Nous avons voulu appliquer cette méthode d'analyse aux phos-

phates du phényl-β-D-glucoside en répétant leur séparation dans les conditions qui avaient servi à analyser les monophosphates du méthyl-α-D-glucoside.

Tout d'abord, nous avons établi quels étaient les monophosphate du phényl-β-D-glucoside qui formaient un complexe avec l'ion borate. Si le pouvoir rotatoire des phényl-β-D-glucosides-4-et-6-phosphate n'est pas sensiblement modifié par addition d'ion borate, celui de leurs isomères les-2-et-3-phosphate est nettement changé. Nous avons conclu alors que les phényl-β-D-glucosides-4-et-6-phosphate n'étaient que peu ou pas complexés par l'ion borate tandis que les-2-et-3-phosphate l'étaient fortement. Ces résultats étaient identiques à ceux observés dans les cas des monophosphates du méthyl-α-D-glucoside. Cependant avec la concentration en borate qui avait permis d'éluer et de séparer les méthyl-α-D-glucosides-4-et-6-phosphate, les phényl glucosides-4-et-6-phosphate restaient adsorbés sur la colonne. Il nous a fallu doubler cette concentration pour en obtenir une élution et une séparation correctes. Or aucun de ces quatre phosphates de sucre n'étant complexé par le borate, seule leur force d'acidité intrinsèque à permis de les analyser par cette méthode de chromatographie. Les phényl glucosides-4-et-6-phosphate se révèlent des acides plus forts que les méthyl glucosides-4-et-6-phosphate, ce qui met en évidence l'influence du groupe aglycone sur l'acidité des phosphates de glycosides.

L'acidité des phényl-β-D-glucosides-2-et-3-phosphate est encore accrue par la présence de l'ion borate. Pour éluer le phényl-β-D-glucoside 2 phosphate, la concentration en tétraborate de potassium doit être 0,186 M, c'est à dire triple de celle utilisée pour l'analyse des monophosphates du du méthyl glucoside . A cette concentration, on peut distinguer les phényl-β-D-glucosides-6,-4-et-2-phosphate, mais le-3-phosphate ne s'élue toujours pas. Ce n'est qu'en employant une solution de

tétraborate 0,248 M(quatre fois plus concentrée que pour les méthyl glucosides phosphorylés) qu'il est élué. On le sépare alors des trois autres monophosphates du phényl glucoside qui à cette concentration de borate sortent ensemble de la colonne. Ainsi, pour identifier les monophosphates formés pendant le traitement alcalin du phényl-β-D-glucoside-4,6-(phényl phosphate) nous avons dû effectuer l'analyse par chromatographie en deux temps : le premier avec une concentration de borate 0,186 M pour détecter dans le mélange de monophosphates la seule présence du phényl glucoside-4-phosphate, le second avec une concentration de borate 0,248 M pour mettre en évidence la formation de phényl-β-D-glucoside-3-phosphate pendant la réaction.

Nous n'expliquons pas la grande acidité du phényl glucoside 3 phosphate. Elle doit être en corrélation étroite avec la réactivité particulière de l'hydroxyles en 3 du glucoside dont nous avons parlé dans un chapitre antérieur.

Sur colonne de Dowex en forme borate, on avait pu appliquer la technique de séparation des méthyl-α-D-glucosides-4-et-6-phosphate aux méthyl-β-D-galactosides-4-et-6-phosphate(36). Seul dans ce cas est interverti l'ordre d'élution, c'est à dire que le-6-phosphate s'élue avant le-4-phosphate. Nous supposions alors pouvoir analyser les phosphates du phényl galactoside en suivant la technique utilisée pour ceux du phényl glucoside, mais il n'y avait pas de séparation entre le phényl galactoside 4 phosphate et le phényl-β-D-galactoside 6 phosphate. En employant des solutions 0,124 M de tétraborate, les phosphates de sucre s'éluaient de façon très diffuse sans maximum précis et en augmentant la concentration, ils sortaient en même temps de la colonne.

Ce phénomène est explicable, car les galactosides-4-phosphate ne sont pas compléxés par le borate tandis que leurs isomères les-6-phosphates forment un complexe;ainsi dans le cas des méthyl ga-

lactosides, le-6-phosphate se trouve être un acide plus fort que le-4-phosphate et par conséquent s'élue après lui. Dans le cas des phényl galactosides, le-6-phosphate complexé doit atteindre l'acidité du-4-phosphate et de ce fait, ne peut être séparé sur résine en forme de borate. Cependant leur acidité intrinsèque est suffisamment différente pour les séparer sur résine avec un éluant légérement acide. Pour cela, nous avons employé une colonne de Dowex en forme de monochloracétate avec pour éluant une solution de monochloracétate de sodium et d'acide monochloracétique.

Nous avons pu ainsi les distinguer nettement et calculer le rapport de leurs quantités après l'hydrolyse alcaline du phényl-β-D-galactoside-4,6-phosphate.

Cependant, les acidités propres des phényl galactosides-2-,3-et-4-phosphate et celles de leurs complexes avec le borate sont très voisines, si bien qu'il est pratiquement impossible de les analyser sur résine en forme borate ou de monochloracétate.

DEUXIEME PARTIE - PARTIE EXPERIMENTALE

CHAPITRE 1

METHODES GENERALES

1 Chromatographie sur papier

Nous avons employé la technique de la chromatographie ascendante sur papier Whatman N°1. Les chromatogrammes n'ayant été faits ni à temps ni la température constants; les valeurs des R_f ne sont donnés qu'à titre indicatif.

Solvants utilisés :

Solvant A : n-Propanol : Ammoniaque concentrée : Eau = 7 : 1 : 2

Solvant B : n-Propanol : Pyridine : Eau = 1 : 1 : 1

Réactifs spécifiques :

Le phosphate a été mis en évidence par le réactif de Hanes et Isherwood (85) : 100 ml du réactif renferment 5 ml d'acide perchlorique à 60 % , 10 ml d'acide chlorhydrique N et 25 ml de molydate d'ammonium à 4 % . On pulvérise un peu de cette solution sur le chromatogramme; ce dernier est ensuite placé pour 7 minutes dans une étuve à 85° puis exposé à la vapeur d'eau et soumis à l'irradiation ultra-violette. Les subtances contenant du phosphate apparaissent en tâche sur fond blanc.

Les sucres réducteurs sont mis en évidence par le phtalate acide d'aniline préparé par dissolution de 1 , 6 g. d'acide phtalique et 930 mg d'aniline dans 100 ml de n-Butanol saturé d'eau. Le réactif est pul-

verisé sur le chromatogramme qui est ensuite maintenu de 5 à 10 minutes à 105° ; les sucres ; les sucres réducteurs se montrent en taches brunes de différentes nuances(86).

Les composés contenant un système ∝-diol apparaissent en taches blanches sur fond bleu sur le chromatogramme soumis à deux pulvérisations sucessives espacées de 5 à 10 minutes, la première avec une solution à 1 % de périodate de sodium dans de l'eau, la seconde avec une solution de 184 mg de benzidine dans 10 ml d'éthanol à 50 % additionnées de 2 ml d'acétone et de 1 ml d'acide chlorhydrique 0,2N (87).

2. Mise en évidence des fonctions acides des phosphates de glucides

Elle s'effectue par titrage potentiométrique, l'acide étant libéré de son sel par une résine échangeuse d'ions (Amberlite IR 120 sous forme acide) et titré par une solution d'hydroxyde de sodium 0,1 N. Les variations du pH en fonction de la concentration en soude sont mesurées avec un pH-mètre Beckmann du type G.

3. Titrage des phosphates de sucre par le périodate de sodium

Dans une fiole jaugée de 25 ml on dissout 0,1 millimole de sustance à titrer dans un peu d'eau (s'il s'agit d'un sel de baryum on ajoute la quantité équivalente de sulfate de sodium). On ajoute ensuite 2,5 ml d'un tampon de pH 3,2(acide acétique/acétate de sodium 1N), le double de la quantité de métaperiodate de sodium théoriquement requis et complète le volume avec de l'eau. La solution est gardée dans l'obscurité à la température ambiante. Comme témoin on prépare dans une autre fiole jaugée une solution analogue mais sans substance à titrer. Le titrage s'effectue ainsi :

Dans un Erlenmeyer de 25 ml, on verse 5 ml d'une solution 0,01 N. d'arsenite de sodium, 5 ml d'une solution saturée de bicarbonate de sodium(9%), 2 ml de la solution à doser ou de celle

prise comme témoin et 0,5 ml d'une solution d'iodure de potassium (20g de KI dans 100 ml d'eau). On rince les parois du récipient à l'eau et laisse reposer le mélange 15 à 20 minutes. L'excès d'arsenite de sodium est dosé par une solution 0,01 N. d'iode avec le thiodène comme indicateur. On peut ainsi calculer la quantité de périodate n'ayant pas réagi. En se référant au témoin, on peut savoir la quantité de périodate consommée par la substance. Les dosages sont faits à intervalles réguliers pour pouvoir tracer la courbe représentant la consommation de périodate par la substance en fonction du temps.

4. Pouvoir retatoire

On pèse une certaine quantité de substance et on la dissout dans un volume connu d'un solvant approprié. La rotation est ensuite mesurée avec un polarimètre à une longueur d'onde définie. Nous avons utilisé un polarimètre Zeiss et la raie du sodium à 589 mμ. Le pouvoir rotatoireest calculé par la formule suivante :

$$[\alpha]_D^t = \frac{100}{c.l}$$

α = la rotation observée à une température donnée

c = la concentration en grammes de substances par 100 ml de solution

l = la longueur du tube polarimètrique en décimètres

5. Préparation des résines Amberlite IR 120 et IR 45

Amberlite IR 120. On prépare la résine en sa forme acide par un lavage à l'acide chlorhydrique 2 N., suivi d'un autre à la soude 2 N. et enfin à l'acide chlorhydrique 2 N. Entre chacune de ces opérations, on lave la colone à l'eau jusqu'à neutralité. Pour les opérations courantes, on considère que 2 ml de résine égalent

un milliéquivalent.

Pour mettre la résine sous forme de sel de cyclohexylamine, on y passe une solution de cette base en évitant toute carbonation et lave la résine avec de l'eau jusqu'à neutralité.

Amberlite IR 45. Pour obtenir cette résine en sa forme basique, on la lave successivement avec une solution de soude 2 N. d'acide chlorhydrique 2 N. et enfin de soude 2 N. en ramenant avec de l'eau les effluents à neutralité entre chaque lavage.

6 . Préparation des colonnes de résines échangeuses d'ions pour les séparations des phosphates de glycosides

La première résine utilisée pour ces séparations est le Dowex 1 x 2 (200 à 400 grains) sous forme borate.

La résine est d'abord lavée à la soude I N. , puis à l'eau jusqu'à neutralité, ensuite à l'acide chlorhydrique I N et à l'eau jusqu'à pH 7. La conversion à la forme borate s'effectue par lavages successifs d'abord avec une solution de tétraborate de potassium 0,124 M pour éliminer les ions chlorures, ensuite à l'eau jusqu'à neutralité et enfin avec 100 ml d'une solution de tétraborate de potassium 0,0186 M. Dans 10 ml de cette solution, on dissout 15 à 20 mg de substance et on les fait adsorber par la résine. La concentration de la solution de borate, utilisée pour l'analyse dépend des phosphates de sucre étudiés et sera précisée dans chaque cas.

La seconde résine était du Dowex 2 sous forme de monochloracétate. Pour mettre la résine sous cette forme, il faut la laver successivement avec de la soude I N. puis de l'acide monochloracétique I N en ramenant les effluents à neutralité avec de l'eau entre chaque lavage.

Avant de faire adsorber la substance, on doit remettre en forme basique quelques centimètres cube de résine au sommet de la

colonne avec 1/2 ml d'une solution très diluée d'ammoniaque . On lave ensuite la résine à l'eau (100ml). Le solvant qui nous a servi à éluer les glycosides phosphorylés était une solution 0,125 N de monochloracétate de sodium et 0,05 N d'acide monochloracétique.

Si les phosphates de sucre étaient isolés en sel de baryum, on les transformait en sel d'ammonium ou de cyclohylammonium avant de les faire adsorber par la résine.

7. Mise en évidence des phosphates de sucres dans les effluents de la colonne

Une solution de 2 g. d'anthrone dans 1 litre d'acide sulfurique à 95 % sert de réactif. On opère dans des tubes à essais de 17 mm de diamètre. A 3 ml de solution à doser, on ajoute 6 ml du réactif , agite fortement le mélange et, au bout d'une demi-heure, détermine à 650 mu dans un colorimètre l'intensité de la couleur verte formée.

8. Préparation des colonnes d'alumine.

L'alumine technique est lavée à l'eau jusqu'à neutralité et séchée. On la tamise à 100 grains, l'active à 180° pendant 24 heures, et la refroidit dans un dessicateur avant de l'utiliser. On emploie 25 g. d'alumine pour 1 g du mélange à chromatographier. La colonne est choisie pour que son diamètre intérieur et la hauteur occupée par l'alumine aient un rapport de 1 à 5. On remplit la colonne avec le solvant utilisé en premier pour la séparation et on y verse très doucement l'alumine en faisant vibrer la colonne pour que le dépot soit très uniforme et sans bulle d'air.

On recueille des fractions d'un volume égal au dixième de celui de la colonne d'alumine et élimine le solvant dans un évaporateur rotatif. On change les proportions des constituants du solvant quand aucun produit ne sort de la colonne. On contrôle le point de fu-

sion de chaque fraction après avoir recristallisé le corps.

9. Séparation sur des colonnes "Chromax LKB"

Ces colonnes sont constituées par une feuille de papier à chromatographie enroulée sur un cylindre de polyéthylène ; le tout est entouré d'un manteau de caoutchouc gonflable pour maintenir la pression uniforme le long de l'ensemble. Un manomètre permet de lire la pression intérieure du manteau.

Les 2 modèles de colonnes employés étaient du type 3501 et 3504, la première permettant, dans nos cas, une séparation d'environ 2 g de mélange, la seconde de 8 g.

Il faut s'assurer avant d'entreprendre une séparation sur de telles colonnes que les substances à séparer ont une différence de Rf d'au moins 0,1 sur le papier Munktell 00 qui forme le rouleau intérieur de ces colonnes.

Nous avons utilisé comme solvant un mélange contenant 70 % de n-Propanol, 10 % d'ammoniaque et 20 % d'eau. On commence par laver avec cette solution le rouleau de papier jusqu'à ce que l'éluant soit limpide.

Pour réaliser ensuite les conditions de séparation les meilleures on fait migrer un colorant et on observe la coloration de la section inférieure du rouleau de papier. Si la pression intérieure et le débit sont corrects pour un solvant et un rouleau donnés, cette coloration doit être uniforme dès l'apparition du colorant. Sinon il faut faire varier la pression et le débit pour obtenir les conditions optimales. Nous avons choisi comme colorant la Rhodamine B qui migre avec le front du solvant que nous avons employé. Les pressions utilisées sont mentionnées dans la description de chaque séparation.

Le volume de solvant nécessaire pour saturer le rouleau de papier a été également déterminé pour chaque séparation. On peut,

en effet, à partir de là prévoir assez précisément à quel volume d'effluent les différentes substances s'élueront de la colonne : En divisant ce volume par le R_f d'un composé donné on obtient en millitres la quantité de solvant qui doit s'écouler avant l'élution du produit.

Pour faire adsorber le mélange sur le papier on le dissout dans la quantité minimale de solvant qui suffit pour recouvrir la section supérieure du rouleau. Quant cette solution est adsorbée, on commence l'élution.

Pour mettre en évidence les phosphates de sucre au sortir de la colonne on teste chaque fraction en faisant la réaction spécifique sur papier des phosphates organiques.

CHAPITRE 11

1°. SYNTHESE DU PHENYL-β-D-GLUCOSIDE-4,6-PHOSPHATE

A. Pentaacétyl-β-D-glucose

Dans un mortier, on broie 40 g. d'acétate de sodium anhydre et 50 g. de glucose sec. Ce mélange est placé dans un ballon de 2 Ldans lequel on verse 250 ml d'anhydride acétique. On munit le ballon d'un réfrigérant et le chauffe sur un bain-marie jusqu'à obtenir une solution claire. Ceci se produit au bout de 30 minutes environ si on agite le mélange de temps en temps. On chauffe encore 2 heures refroidit la solution, distille sous vide le maximum d'anhydride acétique, puis verse lentement le mélange réactionnel dans 250 ml d'eau glacée en maintenant une agitation violente, pendant 1 heure pour détruire l'anhydride acétique. Les cristaux formés sont recueillis par filtration sous vide ; lavés à l'eau et recristallisés dans l'éthanol.

Rendement : 70 g. soit 65 %

Point de fusion : 131° -132°

B. Phényl 2,3,4,6-tétra-O-acétyl-β-D-glucoside

50 g. de phénol et 0,1 g. d'acide p-toluène-sulfonique sont fondus ensemble dans un ballon de 150 ml ; quand la solution est homogène, on ajoute 50 grammes de pentacétyl glucose. Le ballon, plongé dans un bain-marie bouillant est relié à une trompe à vide pour évacuer l'acide acétique formé dans la réaction; un peu de phénol distille également. La masse fondue se colore peu à peu en brun rougeâtre. On maintient la température à 100° pendant 3 heures 1/2- 4 heures puis refroidit rapidement le ballon et reprend le sirop par 150 ml de benzène. Pour éliminer le phénol, la solution benzénique est lavée 5 ou 6 fois avec de la soude à 10 %, glacée, pour éviter l'hydrolyse

des groupes acétyles. Il est nécessaire d'employer environ 300 ml de soude en tout pour que la dernière extraction reste incolore. On lave ensuite la solution à l'eau jusqu'à neutralité et la sèche sur du sulfate de sodium. Par distillation sous pression réduite, on élimine le benzène et recristallise le résidu dans de l'éthanol.

Rendement : 38 g. soit 77 %

Point de fusion : 125° - 126°

$[\alpha]_D^{20} = -22,5°$ c = 2 ; dans $CHCl_3$

C. Phényl-β-D-glucoside.

1) Désacétylation avec de l'ammoniac

25 g. du tétraacétyl phényl-glucoside sont dissous dans 350 ml de méthanol anhydre dans un ballon de 500 cc à deux cols, dont un est fermé par un tube de gel de silice, l'autre muni d'un barboteur pour les gaz. On refroidit le ballon dans un mélange glace-sel et fait passer un courant d'ammoniac pour saturer la solution. Le ballon est gardé 36 heures dans le mélange réfrigérant et de temps en temps, on fait barboter de l'ammoniac dans la solution. On chasse ensuite l'ammoniac et le méthanol par distillation sous vide et dissout le précipité dans de l'éthanol. On décolore la solution avec du noir animal et on laisse cristalliser le produit.

Rendement : 9 g. soit 58 %

Point de fusion : 176°

$[\alpha]_D^{20} = -72,0°$ dans l'eau

2) Désacétylation selon Zemplén

Dans 200 ml de méthanol anhydre, on dissout à chaud 34 g. de phényl 2,3,4,6-tétra-O-acétyl-β-D-glucoside très sec, puis quand la solution est refroidie, on ajoute 10 cc de méthoxyde de sodium I N. La solution brunit fortement, mais s'éclaircit au bout de 48 heures

de repos à la température ambiante. Les ions Na sont fixés sur résine IR 120 en forme acide. On filtre, distille le méthanol et l'acétate de métyle à pression réduite et recristallise le précipité dans du méthanol après avoir décoloré la solution par du noir animal.

Rendement : 75 %

3) Désacétylation selon Leaback

A 4,5g. de phényl 2,3,4,6-tétra-0-acétyl-β -D-glucoside en suspension dans 5 cc de méthanol anhydre ,on ajoute 0,5 cc de méthoxyde de sodium 2 N. La mixture est agitée jusqu'à dissolution complète. Au bout de 15 à 20 minutes, le phényl glucoside cristallise ; on laisse le ballon 18 heures à 5° avant de chasser le méthanol et de recristalliser le produit dans l' éthanol. On obtient 2,1 g. de phényl-β-D-glucoside.

Rendement : 79 %.

D. Préparation du phényl-β-D-glucoside 4,6-(phényl phosphate)

Toute la verrerie employée dans cette réaction doit être parfaitement séchée : elle est placée environ ' ' eure dans une étuve à 180° avant d'être utilisée, les ouvertures au contact de l'air sont ensuite munies de tube remplis de gel de silice ; la substance à phosphoryler est séchée sur pentoxyde de phosphore sous vide à chaud plusieurs heures durant.

Dans un ballon d'un litre à deux cols munis, l'un d'une ampoule à brôme, l'autre d'un thermomètre 35 g. de phényl glucoside dont dissous dans 500 ml de pyridine anhydre. On ajoute goutte à goutte,25 g. de dichloro-phényl phosphate dissous dans 100 ml de pyridine anhydre. L'agitation doit être assez vive. Quand tout l'agent phosphorylant a été ajouté ; on évacue le ballon et le maintient ainsi sous tension de vapeur de pyridine toute une nuit à la température ambiante. On ajoute alors 100 ml d'eau et abandonne la solution

deux heures, pour hydrolyser le dichlorophényl phosphate qui n'a pas réagi ; puis on élimine la pyridine sous vide et triture plusieurs fois le résidu avec de l'eau glacée jusqu'à ne plus percevoir l'odeur de pyridine. Le précipité recueilli par filtration est recristallisé dans l'alcool éthylique en ajoutant de l'eau jusqu'à turbidité.

Rendement : 20 - 22 g. soit 41 %.

Point de fusion : 193 - 194°.

$[\alpha]_D^{20}$ = -86,3°c = 1,04 dans l'éthanol.

E. Préparation du phényl-β-D-glucoside-4,6-phosphate

On dissout 4 g. phényl-β-D-glucoside 4,6-(phényl phosphate) dans 45 ml de dioxane et ajoute 4,2 g. d'hydroxyde de potassium dissous dans 5 ml d'eau : la normalité finale de la solution est 1,5 N en KOH.

On laisse secouer le mélange hétérogène pendant 18 heures, à la température ambiante ; on ajoute alors 20 ml d'eau pour homogénéiser la solution et ramène le pH à 4 avec de la résine IR 120 sous forme acide. On chasse le dioxane à froid sous pression réduite puis extrait le phénol formé dans la réaction par plusieurs lavages avec de l'éther ethylique. On élimine l'éther sous vide et transforme le sel de potassium du phényl glucoside-4,6-phosphate en sel de cyclohexylamine par passage de la solution sur une colonne de résine IR 120 sous forme de sel de cyclchexylamine. On concentre les effluents de la colonne sous pression réduite et recristallise le précipité dans un mélange éthanol-eau. La cristallisation est très lente. On obtient 1 g. de substance pure.

Rendement : 43 %

Point de fusion : 220° avec décomposition.

Rf : Solvant A : 0,63.

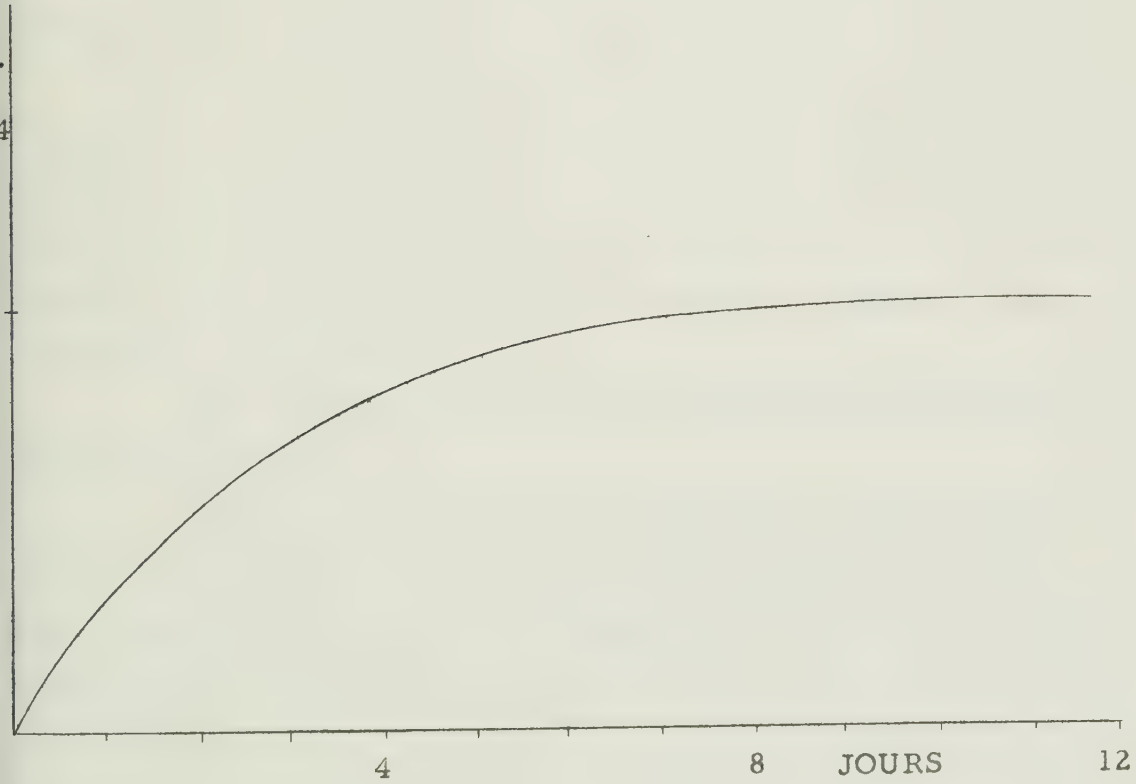
$[\alpha]_D^{24} = -58,5°$ (C = 1,04 dans l'eau)

$[\alpha]_D^{24} = -56,5°$ (C = 1,06 dans une solution de tétraborate de potassium 0,372M)

Analyse : $C_{18}H_{28}O_8NP$ PM = 417

Taux calculés	Taux trouvés
C = 51,79 %	C = 51,84 %
H = 6,71 %	H = 6,72 %
N = 3,35 %	N = 3,52 %
P = 7,45 %	P = 7,64 %

Le titrage potentiométrique de ce corps ne revèle qu'une dissociation acide. La substance consomme lentement un équivalent de périodate.



2° SEPARATION SUR COLONNE "CHROMAX" DU PHENYL -β-D-GLUCOSIDE-4,6-PHOSPHATE DES MONO PHOSPHATES DU PHENYL-β-D-GLUCOSIDE

Pour cette séparation nous avons utilisé la colonne du type 3501. Le solvant et la technique de mise en route pour effectuer une séparation sur les colonnes "Chromax" ont été indiqués dans le premier chapitre de la partie expérimentale.

La pression était de 1,300 Kg et il fallait 130 ml de solvant pour saturer le rouleau de papier.

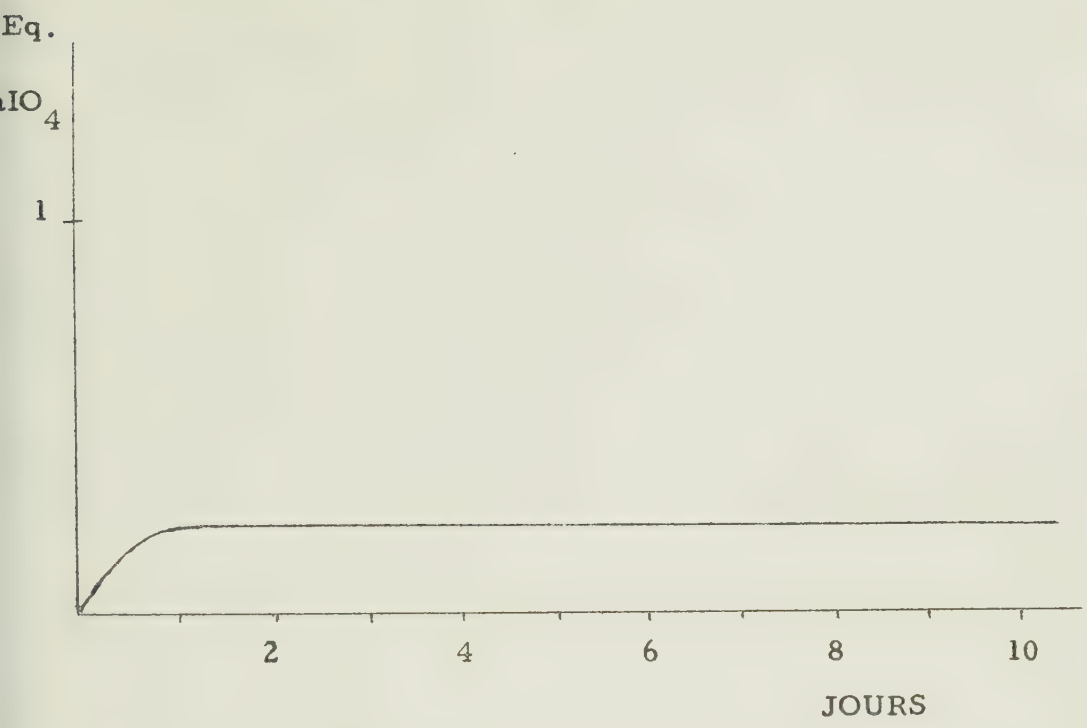
Nous avons séparé 600 mg de mélange de sels cyclohexylamine en recueillant des fractions de 10 ml à raison d'une par demi heure. Comme prévu le phosphate cyclique est sorti au bout de 170 ml et la fraction monophosphates à 240 ml.

Nous avons groupés les fractions contenant les différents phosphates de sucre et avons concentré les solutions obtenues.

Celles ci, souillées avec un peu de cellulose dégradée provenant de la colonne, sont traitées avec du noir animal. On filtre ensuite et on acidifie les solutions avec de l'IR 120 en forme acide puis après une seconde filtration on les neutralise avec de l'hydroxyde de baryum. On précipité les sels de baryum par de l'éthanol et les recueille par centrifugation.

Nous avons isolé 400 mg de monophosphates et 150 mg de phosphate cyclique.

La fraction monophosphate présente une bande d'absorption à 268 mμcorrespondant au groupe phényle lié au carbone 1 du sucre. Elle consomme un quart d'équivalent de périodate comme l'indique la courbe ci-dessous.



La titration potentiométrique révèle qu'il s'agit d'un mono-ester de l'acide phosphorique. L'analyse sel de baryum montre que ce mélange ne peut être composé que de phosphate primaires de phényl glucoside.

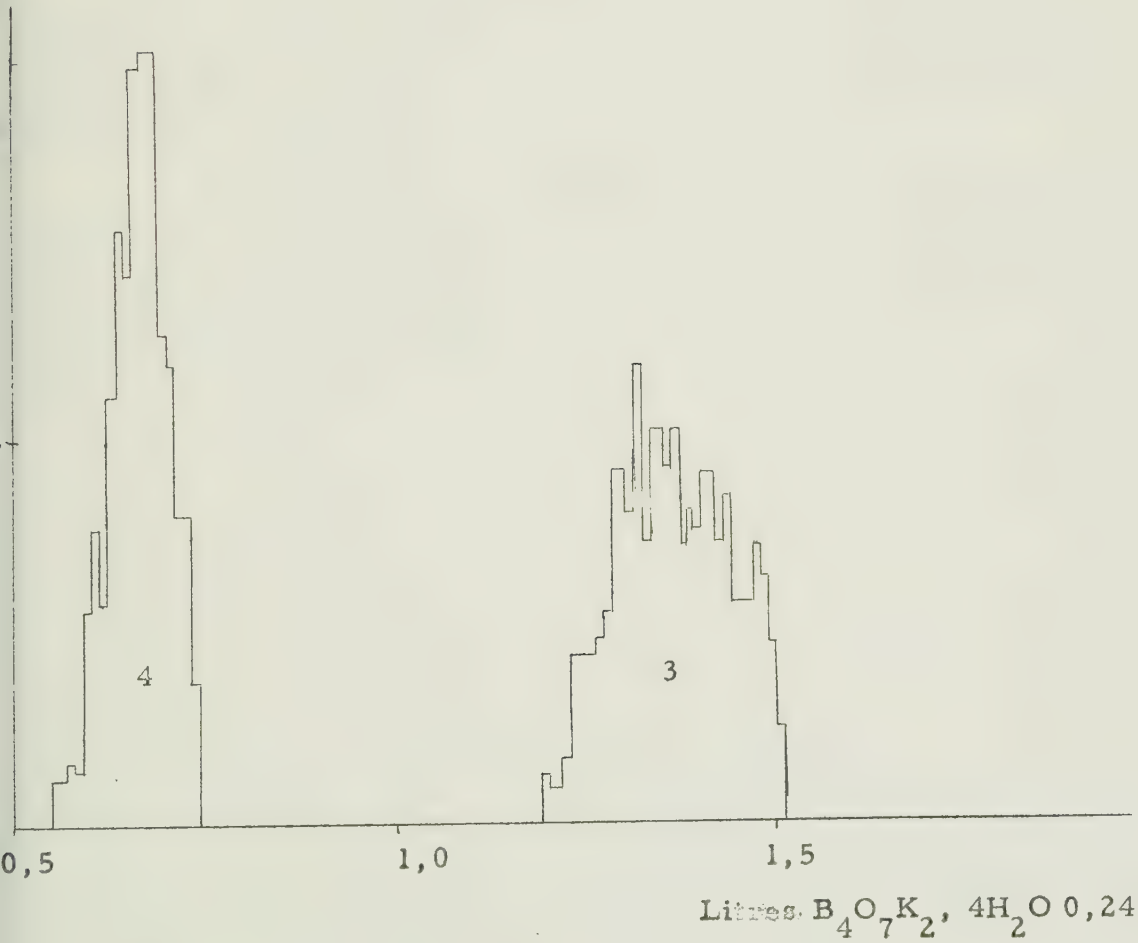
Analyse : $C_{12}H_{15}O_9P\ Ba\ ,\ 2H_2O$ P.M. = 507

Taux calculés	Taux trouvés
C = 28,40 %	C = 28,99 %
H = 3,74 %	H = 3,99 %
P = 6,11 %	P = 6,10 %
Ba = 26,90 %	Ba = 25,79 %

3°. INDENTIFICATION DES MONOPHOSPHATES FORMES PENDANT LE TRAITEMENT ALCALIN DU PHENYL-β-D-GLUCOSIDE 4,6 -PHENYL-PHOSPHATE PAR ANALYSE CHROMATOGRAPHIQUE SUR UNE COLONNE DE RESINE ECHANGEUSE D'IONS.

Pour cette analyse nous avons utilisé une colonne de Dowex 1 x 2 sous sa forme borate préparée comme il est indiqué dans le chapitre des Méthodes Générales.

Comme éluant nous avons employé une solution de borate de potassium 0,2 48 M et nous avons obtenu la courbe de séparation suivante :



4° HYDROLYSE ALCALINE DU PHENYL-β-D-GLUCOSIDE 4,6-PHOSPHATE

Dans un ballon de 50 ml muni d'un réfrigérant surmonté par un tube à chaud sodée, on dissout 1 gr. de sel cyclohexylamine du phényl-β-D-glucoside-4,6-phosphate dans 25 ml de baryte 0,05 N On chauffe cette solution pendant 3 heures sur un bain-marie bouillant, la refroidit, puis l'acidifie par de l'IR 120 en forme acide. On la filtre et la neutralise avec de la cyclohexylamine. On élimine l'eau par distillation sous pression réduite et recristallise le résidu solide dans de l''éthanol.

Le sel de cyclohexylamine du phényl-β-D-glucoside -6-phosphate cristallise le premier. Par cristallisation fractionnée, on arrive à séparer le phényl-β-D-glucoside-6-phosphate du phényl-β-D-glucoside-4-phosphate.

A partir de 1 gr. de phosphate cyclique, nous avons obtenu 800 mg. de mélange de sels de cyclohexylamine d'ou nous avons pu retirer 130 mg de phényl-β-D-glucoside-6-phosphate et 450 mg de phényl-β-D-glucoside-4-phosphate.

Constantes physiques du phényl-β-D-glucoside-4-phosphate, sel de cyclohex. Point de fusion : 188° décomposition

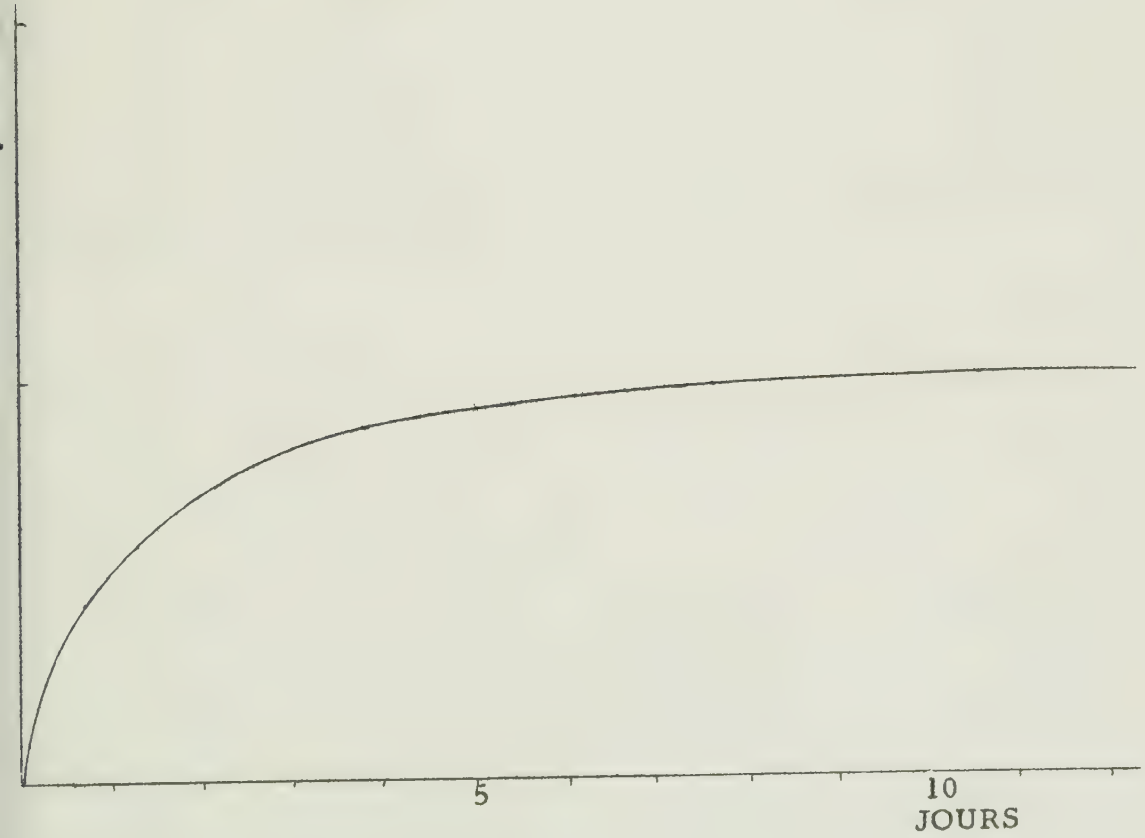
Rf dans solvant A : 0,42

$[\alpha]_D^{24°,9}$ = - 31°(C= 0,5 dans l'eau)

$[\alpha]_D^{24°,9}$ =-34° (C=0,5 dans une solution de tétroborate de potassium 0, 372 M)

Analyse : $C_{24}H_{43}N_2P, 2H_2O$ P.M. = 570

Taux calculés	Taux trouvés
C = 50,51 %	C = 50,83 %
H = 8,31 %	H = 7,97 %
N = 4,91 %	N = 5,00 %
P = 5,43 %	P = 5,78 %



Cette substance consomme très lentement un équivalent de périodate comme l'indique la courbe ci-dessus.

Constantes physiques du phényl-β-D-glucoside-6-phosphate, sel de cyclohex. Point de fusion : 190°

Rf dans le solvant A : 0,34

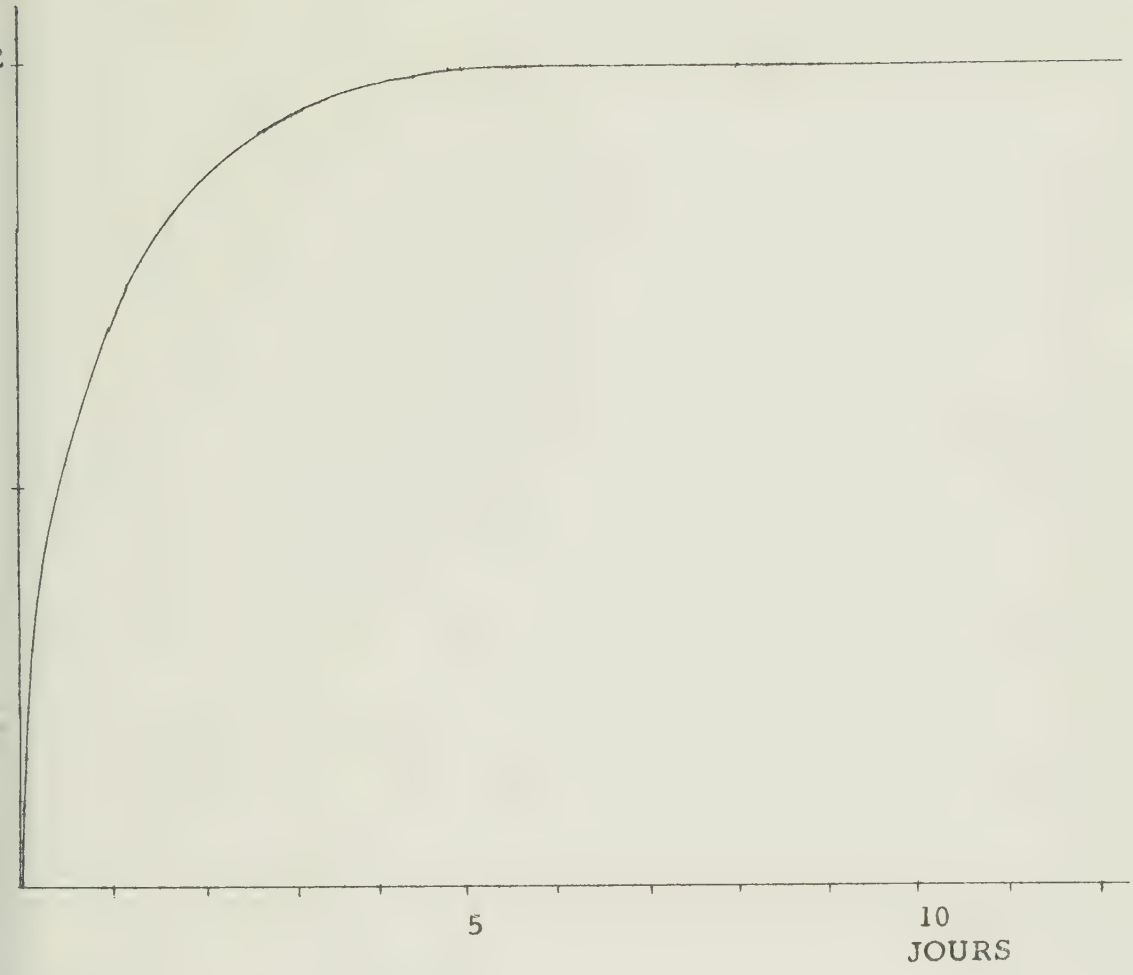
$[\alpha]_D^{24°,9} = -53°$ (C = 1,02 dans l'eau)

$[\alpha]_D^{24°,9} = -50,5°$ (C = 1,02 dans le tétrate de potassium 0,372 M)

Analyse : $C_{24}H_{43}O_9N_2P\,H_2O$ P. M. = 552

Taux calculés	Taux trouvés
C = 52,17 %	C = 51,76 %
H = 8,28 %	H = 8,06 %
N = 5,07 %	N = 5,41 %
P = 5,61 %	P = 5,96 %

Ce corps consomme rapidement deux équivalents de périodate comme l'indique la courbe ci-dessous :

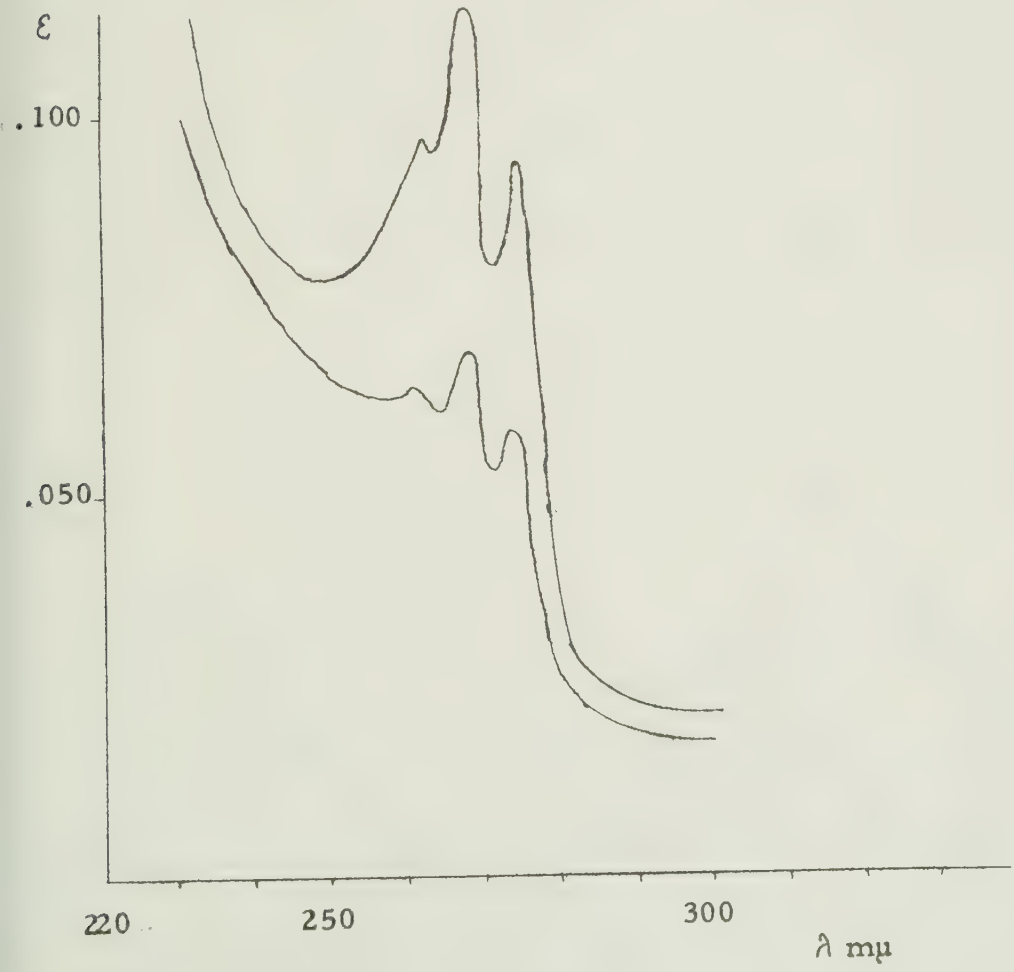


5° EVALUATION DES PROPORTIONS DES PHENYL-β-D-GLUCOSIDE-4- ET-6-PHOSPHATES OBTENUS DANS L'HYDROLYSE ALCALINE DU PHENYL-β-D-GLUCOSIDE 4,6-PHOSPHATE

A. Par chromatographie sur papier

On prépare une solution concentrée du produit obtenu par hydrolyse alcaline du phényl-β-D-glucoside 4,6-phosphate cyclique, sans le cristalliser. On en absorbe sur du papier Wathmann n°3 jusqu'à ce que le papier soit saturé. Deux tâches sont placées à 2 centimètres de distance sur un même chromatogramme de 6 centimètres de large. Le solvant doit être fraichement préparé. On le laisse

monter pendant une nuit. Le lendemain, on sépare le chromatogramme en deux et révèle sur l'un des deux papiers les zones où se trouvent les phosphates de sucre. On découpe alors sur l'autre partie les zones correspondantes, dont on taille un coté en pointe. On suspend dans un ballon ces morceaux de papier à l'extrémité d'un réfrigérant ascendant et laisse refluer pendant une heure ou deux, 10 cc d'éthanol qui, en se condensant élue les phosphates de sucre. On prélève un ml de cette solution, le verse dans une fiole jaugée de 5 cc, et complète le volume avec de l'éthanol. On détermine la courbe d'absorption en ultraviolet des groupes phényles liés au sucre. On obtient les deux courbes suivantes :

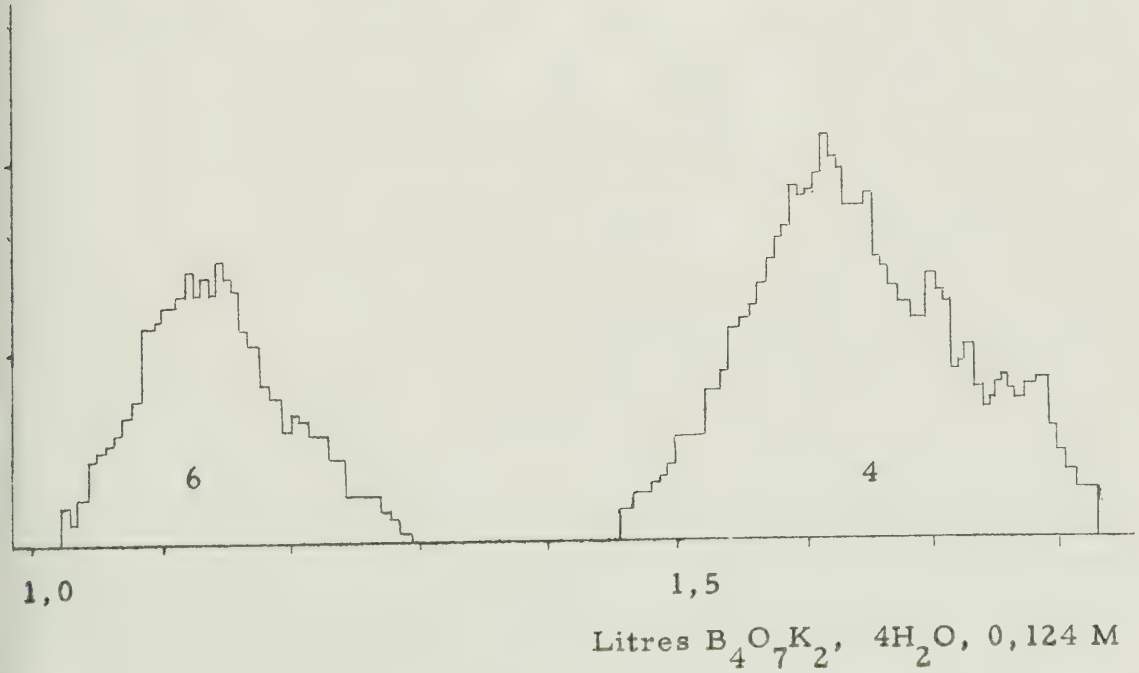


Cette méthode, moins précise que la méthode utilisant une colonne de Dowex indique qu'il y a 1,7 fois plus de 4 phosphate que de 6 phosphate.

B. Par séparation sur une colonne de Dowex 1 x2

Après les différents lavages, la résine occupait dans une colonne de 1,6 cm de diamètre une hauteur de 28 cm. 30 mg de mélange ont été dissous dans 10 ml de borate de potassium 0,0186 M et adsorbés sur la colonne. Nous avons employé comme éluant de borate de potassium 0,124 M et recueilli 3 fractions de 6 ml par heure.

Pour déterminer les proportions relatives des phényl-β-D-glucoside-4-phosphate et 6-phosphate, on mesure l'adsorption de solutions de concentrations connues des deux sucres et en établit alors deux courbes étalons suffisament précices pour les faibles concentrations l'on a ici. On reporte ensuite l'absorption de chaque fraction et détermine ainsi la concentration en sucre. On a trouvé que le mélange était constitué de 2,5 fois plus de 4-phosphate que de 6-phospha te.



6°. SYNTHESE DE GLUCOSE 4 PHOSPHATE

A. Par hydrogénolyse du phényl-β-D-glucoside 4-phosphate

100 mg. du sel de cyclohexylamine du phényl-β-D-glucoside 4-phosphate sont dissous dans un mélange éthanol-eau. Avec la résine IR 120 sous forme acide, on amène le pH de la solution à 2. Puis on filtre et hydrogénolyse le groupe phényle avec du platine comme catalyseur. Quand la quantité théorique d'hydrogène est consommée, on filtre, neutralise la solution par de la baryte jusqu'a pH 6,5-7 et précipite par de l'éthanol le sel de baryum que l'on recueille par centrifugation.

Rendement : 38 mg de sel de baryum, soit 80 %. Le Rf dans les solvants A et B est le même que celui du glucose 4 phosphate préparé par la méthode de REITHEL et CLAYCOMB, soit 0,32.

B. Selon REITHEL et CLAYCOMB

1) 1, 2, 3, 4- tétra-0-acétyl-6-trityl-β-D-glucose

Un mélange de 120 g. (0,67 mole) de glucose anhydre et 193,2 g. de triphénylchlorométhane est dissous dans 500 ml de pyridine anhydre et chauffé sur bain-marie jusqu'à dissolution complète. Sans refroidir, on ajoute d'un seul trait 360 cc d'anhydride acétique. Après 12 heures de repos à la température ambiante, le mélange réactionnel est versé lentement dans une solution de 500 ml d'acide acétique dans 10 litres d'eau glacée. Cette adjonction se fait sous une agitation violente que l'on poursuit deux heures durant. Le précipité recueilli par filtration est rapidement remis en suspension dans 10 litres d'eau glacée. On le recueille à nouveau, le lave à l'eau froide et le sèche à 4° dans un déssicateur sur pentoxyde de phosphore. Le précipité une fois sec, est lavé avec 500 ml d'ether, puis recristallisé dans environ 3 litres d'éthanol à 95 %. La solution est décolorée par du noir animal et filtrée à chaud. En se refroidissant, elle

laisse déposer de fines aiguilles de 6 tritryl- -D-glucose 1,2,3,4 tétraacétate d'une pureté suffisante pour l'usage suivant.

Rendement : 169 g. = 49%

Point de fusion : 166° -166,5°

$$\left[\alpha\right]_D^{19°} = 44°,8$$

2) 1,2,3,4-tétra-0-acétyl-β-D-glucopyranose

46 g.(0,078 mole) du produit précédent sont dissous à chaud dans 200 ml d'acide acétique, puis refroidis à 10°, 18 ml d'une solution saturée de HBr dans l'acide acétique sont ajoutés et le mélange est secoué pendant 45 secondes environ. Par filtration, on élimine tout de suite le bromure de trityle formé pendant la réaction et verse le filtrat immédiatement dans un litre d'eau froide. Le tétracétate est extrait avec 250 ml de chloroforme, que l'on lave 4 fois avec de l'eau glacée et sèche sur du sulfate de sodium. On filtre et élimine le solvant par distillation sous pression réduite à la température ambiante. Le sirop restant est couvert avec 100 ml d'éther de pétrole et frotté avec une baguette de verre : la cristallisation est immédiate;On purifie le produit en le recristallisant dans un peu de chloroforme auquel on ajoute de l'éther de pétrole jusqu'à l'apparition des premiers cristaux.

Rendement : 70 %

Point de fusion : 128° - 129°

$$\left[\alpha\right]_D^{20} = 12°1$$

3) 1,2,3,6-tétra-O-acétyl-β- D-glucopyranose

A 11,2g. du tétracétate pur précédent en solution dans 110 ml d'éthanol à 95 % on ajoute 2,8 ml d'hydroxyde de potassium 0,IN. Le pouvoir rotatoire change de + 4,49° à -1,03° en une minute ; à l'aide d'acide acétique 0,5 N, on acidifie la solution alcoolique que l'on concentre de moitié. En ajoutant un peu de pyridine, la cristal-

lisation commence immédiatement. On purifie encore le produit par deux cristallisation successives l'une dans de l'éther éthylique à 10 % de pyridine, l'autre dans l'éthanol à 95 %.

Rendement : 3,9 g. soit 32 %

Point de fusion : 131°,5 - 132°,5

$[\alpha]_D^{22}$ = -28,6° dans le chloroforme.

4) 1,2,3,6-tétra-O-acétyl-β-D-glucose-4-diphenyl phosphate

On dissout à chaud 2 g. de tétraacétyl glucose dans 25 ml de pyridine anhydre, puis on refroidit la solution et on y ajoute 1,7 g. de diphenyl phosphorochloridrate en solution dans 10 ml de pyridine anhydre. Si la solution se trouble, on doit la chauffer jusqu'à dissolution complète. L'addition du mélange phosphorylant requiert environ 30 minutes ; on laisse la solution 24 heures à 20° ; puis, on chasse la pyridine par distillation à pression réduite à température ambiante et verse lentement le sirop restant dans 170 ml d'eau glacée. Le précipité blanc granuleux est recueilli par filtration, puis dissous dans 10 ml de chloroforme. On lave d'abord la solution avec de l'acide chlorhydrique dilué pour éliminer les traces de pyridine et ensuite avec de l'eau. Le chloroforme est éliminé par distillation sous vide et le résidu recristallisé dans de l'éthanol ou de l'acétone aqueux.

Rendement : 1,5 g. soit 46 %

Point de fusion : 146°,5 - 147°.5

$[\alpha]_D^{25}$ = -34,4° dans le chloroforme.

5) 1,2,3,6-tétra-O-acétyl-β-D- glucose-4- (dihydrogène phosphate)

850 mg. de 1,2;3,6-tétracétyl glucose-4-diphényl phosphate sont dissous dans 20 ml d'acétate d'éthyle. Avec 100 mg. d'oxyde de

platine comme catalyseur on opère une hydrogénation. Au bout de deux heures et demi, 270 ml d'hydrogène sont consommés. La solution est alors filtrée, concentrée jusqu'à 5 ml et abandonnée à - 10° quelque temps ; il se dépose alors 550 mg de cristaux.

Rendement : 80 %

Point de fusion : 168°

$[\alpha]_D^{20}$ = -0,42 C = 1,2 dans l'eau.

6) Glucose-4-phosphate

Le composé précédent pur et cristallin est dissout dans de l'eau et neutralisé avec de la soude jusqu'au virage de la phénolphtaléine, puis l'eau est distillée sous pression réduite. On dissout le résidu dans du méthanol absolu et ajoute une petite quantité de méthoxyde de sodium. Le sel disodique du glucose-4-phosphate précipite de suite. On le centrifuge après l'avoir gardé 12 heures à 0°, le lave au méthanol absolu et à l'ether. C'est un solide hygroscopique dont le pouvoir rotatoire est $[\alpha]_D^{20}$ = + 51,5 C = 2,1 dans l'eau.

On l'a retransformé en sel de baryum non hydroscopique et on a eu 400 mg. de produit. Rendement = 90 %.

7°. SYNTHESE DU GLUCOSE-6-PHOSPHATE PAR HYDROGENOLYSE DU PHENYL-β-D-GLUCOSIDE-6-PHOSPHATE

30 mg. de phényl-β-D-glucoside-6-phosphate sont dissous dans 30 ml d'éthanol et la solution est acidifiée par addition de IR 120 en forme acide. On filtre, ajoute 100 mg d'oxyde de platine comme catalyseur et hydrogène la substance dans les conditions normales. Quand la quantité théorique d'hydrogène est consommée, on élimine la catalyseur par filtration, neutralise la solution par de la cyclohexylamine, chasse l'éthanol et retransforme le sel de cyclohexylamine en sel de baryum que l'on précipite par de l'éthanol. Le corps obtenu

à le même R_F dans le solvant B que le glucose-6-phosphate authentique.

8°. SYNTHESE DU PHENYL-β-D-GLUCOSIDE-2-PHOSPHATE

A) Préparation du phényl 4,6-benzylidène-β-D-glucoside

Dans un flacon d'un litre, on suspend 100 grammes de phényl-β-D-glucoside (cf. préparation page70) dans 400 g. d'aldéhyde benzoïque fraichement distillé sous azote. On ajoute rapidement 105 g. de chlorure de zinc fondu pulvérisé, on ferme hermétiquement la bouteille et fait agiter le tout pendant 12 heures. Ensuite le mélange gélatineux est versé dans du pentane ou dans de l'éther de pétrole sous une agitation violente pour désagréger les grumeaux formés. On filtre et reprend le précipité plusieurs fois dans l'un de ces deux solvants pour éliminer le plus possible de benzaldéhyde. Après 4 ou 5 lavages aux solvants organiques, on en effectue plusieurs dans les mêmes conditions à l'eau glacée pour éliminer le chlorure de zinc ; on recueille et sèche le précipité que l'on recristallise dans un mélange éthanol-acétone.

Rendement : 105 - 100 g. soit 75 -80 %

Point de fusion : 194° -195°

$\left[\alpha\right]_D^{25} = -56,2°$ (C = 2 dans l'acétone)

B) Préparation du phényl 4,6-benzylidène-3-O-benzoyl-β-D-glucoside.

Quatre grammes de phényl 4,6-benzylidène-β-D-glucoside sont dissous dans 4 ml de pyridine anhydre et refroidis à -10° ; on ajoute alors très lentement 1,62 g. de chlorure de benzoyle fraîchement distillé en solution dans 20 ml de pyridine anhydre, refroidie aussi à -10°. L'addition demande 1 heure environ. La température oscille entre - 10° et -4°. On laisse le mélange à 0° toute la nuit.

Le lendemain, on verse la solution dans de l'eau glacée, et on extrait le précipité dans du chloroforme que l'on lave d'abord avec de l'acide sulfurique à 1 % glacé, puis avec du bicarbonate de sodium et enfin à l'eau distillée jusqu'à neutralité. On sèche le chloroforme sur du sulfate de sodium, le distille à pression réduite et obtient un résidu cristallin.

On prépare alors une colonne d'alumine comme il est précisé dans le chapitre "Méthodes Générales" (p.62). On dissout le mélange dans 10 cc d'acétate d'éthyle et y ajoute du benzène jusqu'à apparition d'un léger trouble ; il en faut environ 50 ml.

On absorde cette solution sur la colonne et l'élue avec des mélanges dont les proportions sont données ci-dessous. On recueille des fractions de 50 ml que l'on concentre sous vide. On change les proportions des solvants quand aucun corps ne sort plus de la colonne.

BENZENE	ACETATE D'ETHYLE	PRODUIT ELUE	POINT DE FUSION
4	1	Phényl 4,6-benzylidène 2,3 dibenzoyl-β-D-glucoside	203°
4	2	Mélange	192°
3	2	Phényl 4,6-benzylidène - 3-benzoyl-β-D-glucoside	207°
METHANOL		Phényl 4,6-benzylidène -β-D-glucoside	

On a obtenu 600 mg soit 9 % de dérivé monobenzolé et 3g. de dérivé dibenzolé soit 47 % ; le reste étant du produit départ.

Analyses: 1) Phényl 4,6-benzylidène-3-0-benzoyl-β-D-glucoside :

$C_{26}H_{24}O_7$ P.M. = 448

Taux calculés	Taux trouvés
C = 69,64 %	C = 69,77 %
H = 5,35 %	H = 5,52 %

$[\alpha]_D^{24°,5} = -72°$ (C = 1,05 dans le chloroforme)

2) Phényl 4,6-benzylidène-2,3-di-0-benzoyl-β-D-glucoside :

$C_{33}H_{28}O_8$ P.M. = 552

Taux calculés	Taux trouvés
C = 71,74 %	C = 71,78 %
H = 5,07 %	H = 5,17 %

$[\alpha]_D^{24°,5} = +37,5°$ (C = 1,04 dans le chloroforme)

Les spectres infra-rouges de ces deux substances ont été déterminées (pastille de KBr, Perkin-Elmer Modèle 21) : seul le premier composé présentait une bande dans la région de 3600 cm^{-1} indiquant la présence d'un groupe hydroxyle libre.

Pour préparer 5 grammes du monobenzoate la préparation a été effectuée en partant de 30 g de phényl 4,6-benzylidène-β-D-glucoside.

C. Préparation du phényl 4,6-benzylidène 3-0-benzoyl-β-D-glucoside 2-(hydrogène pyridinium phosphate)

On dissout 2 g. de phényl 4,6-benzylidène-3-D-benzoyl-β-D-

glucoside dans 15 ml de pyridine et refroidit la solution dans un bain de carboglace-acétone. On y ajoute 700 mg. d'oxychlorure de phosphore dissous dans 5 ml de pyridine et préalablement refroidi à -30°. Cette adjonction doit s'effectuer à très basse température (-30°). On laisse la température remonter lentement jusqu'à atteindre celle ambiante, où le mélange réactionnel reste 12 heures. On ajoute alors un peu d'eau pour détruire l'excès de l'agent phosphorylant. On chasse la pyridine à pression réduite, reprend le résidu dans du chloroforme et lave la solution plusieurs fois à l'eau glacée pour éliminer le phosphate et le chlorure de pyridine formés. Puis on sèche le chloroforme sur du sulfate de sodium, l'évapore par distillation sous pression réduite et recristallise le résidu dans de l'éthanol.

Rendement : 2,300 g. soit 88 %

Point de fusion : 143° - 145°

$\left[\alpha\right]_D^{25°}$ =-66° (C = 1,02 dans la pyridine)

Analyse : phényl 4,6-benzylidène-β-D-glucoside-2-(pyridinium hydrogène phosphate) : $C_{30}H_{36}O_{10}NP$ P.M. = 596

Taux calculés	Taux trouvés
C = 60,03 %	C = 60,02 %
H = 5,29 %	H = 5,44 %
N = 2,34 %	N = 2,20 %

D) Préparation du phényl-β-D-glucoside-2-phosphate

Le corps précédent est dissous dans l'éthanol et on amène le pH entre 1 et 2 avec de l'IR 120 sous forme acide que l'on filtre ensuite. On fait bouillir la solution 10 à 15 minutes. Puis on neutralise l'acide libre par de la cyclohexylamine et élimine l'éthanol par distillation sous pression réduite. Le précipité recueilli est très bien

séché avant d'être redissous dans du méthanol anhydre ; on ajoute alors une petite quantité de méthoxyde de sodium catalytique pour éliminer le groupe benzoyle et laisse la solution à température ambiante toute la nuit. On enlève les ions Na par l'IR 120 en forme acide, chasse le méthanol par distillation à pression réduite et recristallise le résidu dans l'éthanol. On a obtenu 900 mg. de sel cyclohexylamine.

Rendement = 43 %

Point de fusion : 180° décomposition

Rf dans le solvant A : 0,38

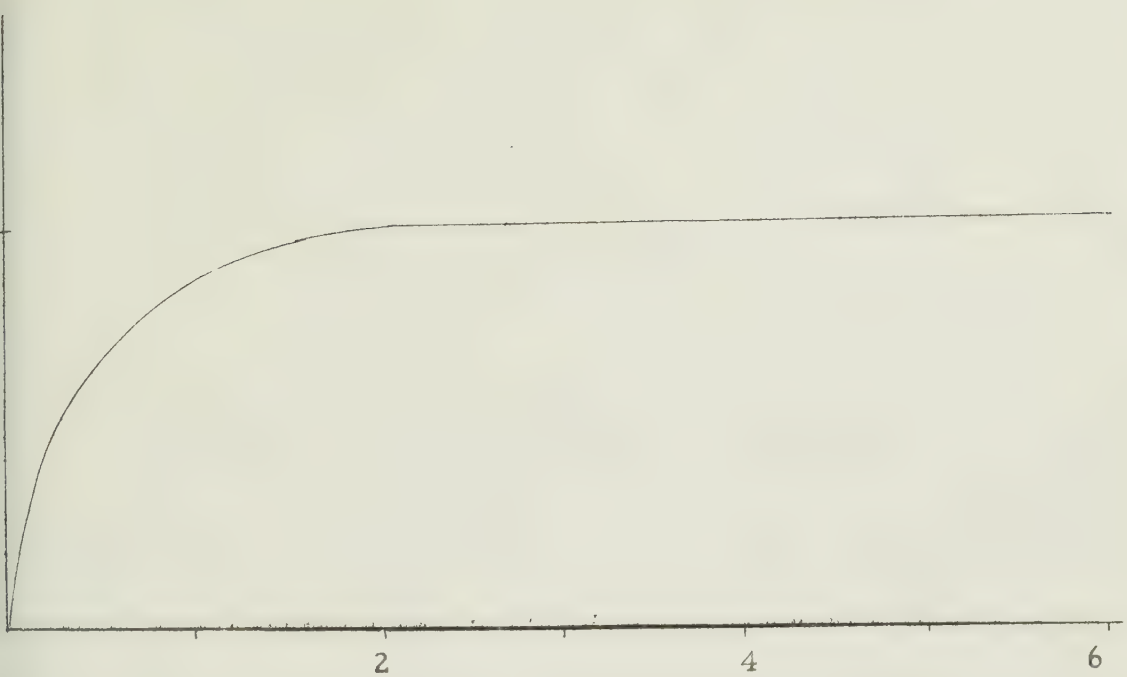
$[\alpha]_D^{25,2°}$ = - 29;2° (C = 1 dans l'eau)

$[\alpha]_D^{25,2°}$ = - 39,2° (C = 1 dans une solution de tétraborate de potassium 0,372 M)

Analyse : $C_{24}H_{43}O_9N_2P$ H_2O P.M. = 552

Taux calculés	Taux trouvés
C = 52,24 %	C = 52,00 %
H = 8,28 %	H = 8,24 %
N = 5,07 %	N = 5,17 %
P = 5,61 %	P = 5,24 %

Un tirage potentiométrique montre que cette substance possède deux dissociations acides ; elle consomme un équivalent de périodate comme le montre la courbe ci-dessous.



8° SYNTHESE DU PHENYL- ß-D-GLUCOSIDE-3-PHOSPHATE

A . Préparation du phényl 4,6-benzylidène-ß-D-glucoside-2,3-(phényl phosphate)

Dans 50 ml de pyridine anhydre , on dissout 5 g. de phényl 4,6-benzylidène-ß-D-glucoside et ajoute très lentement 3,100 g. de dichlorophényl phosphate dissous dans 10 ml de pyridine anhydre. On laisse le mélange réactionnel 18 heures à la température ambiante, puis ajoute 10 ml d'eau pour détruire l'excès d'agent phosphorylant. On laisse reposer le tout encore une heure avant de distiller la pyridine à pression réduite. On redissout le résidu dans du chloroforme que l'on lave avec de l'acide sulfurique à 1 % $^{v}/_{v}$ en évitant d'atteindre un pH trop acide. On sèche la solution sur du sulfate de sodium, et chasse le chloroforme par distillation à pression réduite. On obtient 4,600 g. d'un corps huileux. Par cristallisation dans du benzène on peut obtenir quelques cristaux (300 mg.) de phényl 4,6-benzylidène-ß-D-glucoside-2,3-phényl phosphate.

Point de fusion : 282°

Analyse: $C_{25}H_{23}O_8P$, H_2O P.M = 500

Taux calculés	Taux trouvés
C = 60,00 %	C = 60,88 %
H = 5,00 %	H = 4,93 %
P = 6,20 %	P = 6,10 %

B. Préparation du phényl-β-D-glucoside-3-phosphate

L'huile précédemment obtenue est dissoute dans 40 ml de dioxanne. On y ajoute d'un trait une solution de 4,2 g. d'hydroxyde de potassium dans 10 ml d'eau. La normalité de la solution en KOH est alors 1,5 N. On agite cette solution pendant une nuit; le lendemain, on l'acidifie par de l'IR 120 en forme acide, filtre, puis neutralise directement avec de la cyclohexylamine.

On chasse ensuite le dioxanne et l'eau par distillation sous pression réduite et reprend le résidu dans de l'éthanol.

Pour éliminer le groupe benzylidène, on ajoute un peu de résine IR 120 pour amener le pH de la solution à 2 et fait bouillir la solution alcoolique une heure sur bain-marie, puis on la refroidit et la neutralise avec de la cyclohexylamine. On chasse l'éthanol jusqu'à un faible volume et laisse reposer la solution pendant une nuit. Il se dépose alors des cristaux de phényl-β-D-glucoside-2-phosphate que nous avons identifiés par chromatographie avec du 2 phosphate authentique (100 mg.)

Rf dans le solvant A : 0,38

Par cristallisation fractionnée dans de l'éthanol, on peut isoler le phényl-β-D-glucoside-3-phosphate.

Rendement : 2,3 g. soit 30 %

Point de fusion : 164° - 165°

Rf dans le solvant A. : 0,47

$[\alpha]_D^{25°}$ = - 28° (C = 1 dans l'eau)

$[\alpha]_D^{25°}$ = - 39° (C = 1 dans une solution de tétraborate de potassium 0,372 M)

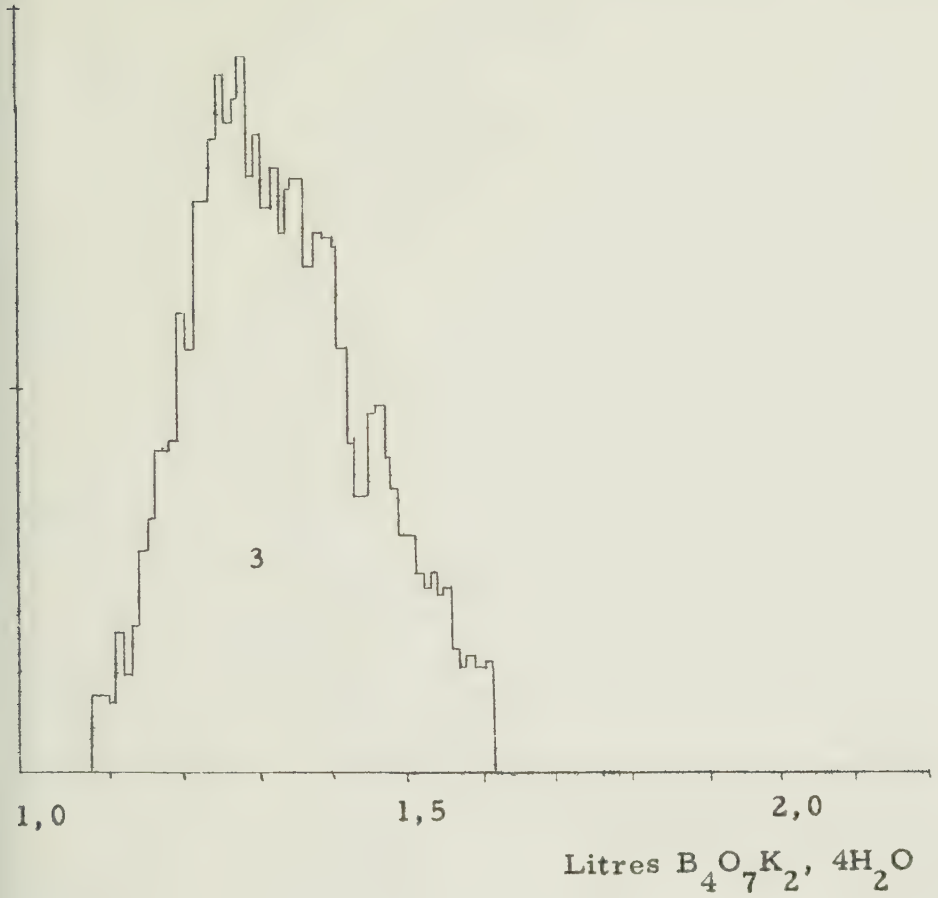
Analyse : $C_{24}H_{43}O_9N_2P\ 2H_2O$ P.M. = 570

Taux calculés	Taux trouvés
C = 50,51 %	C = 50,40 %
H = 8,31 %	H = 8,28 %
N = 4,91 %	N = 4,83 %
P = 5,43 %	P = 5,61 %

Ce phosphate de sucre ne consomme pas de périodate même en restant à son contact pendant plusieurs jours.

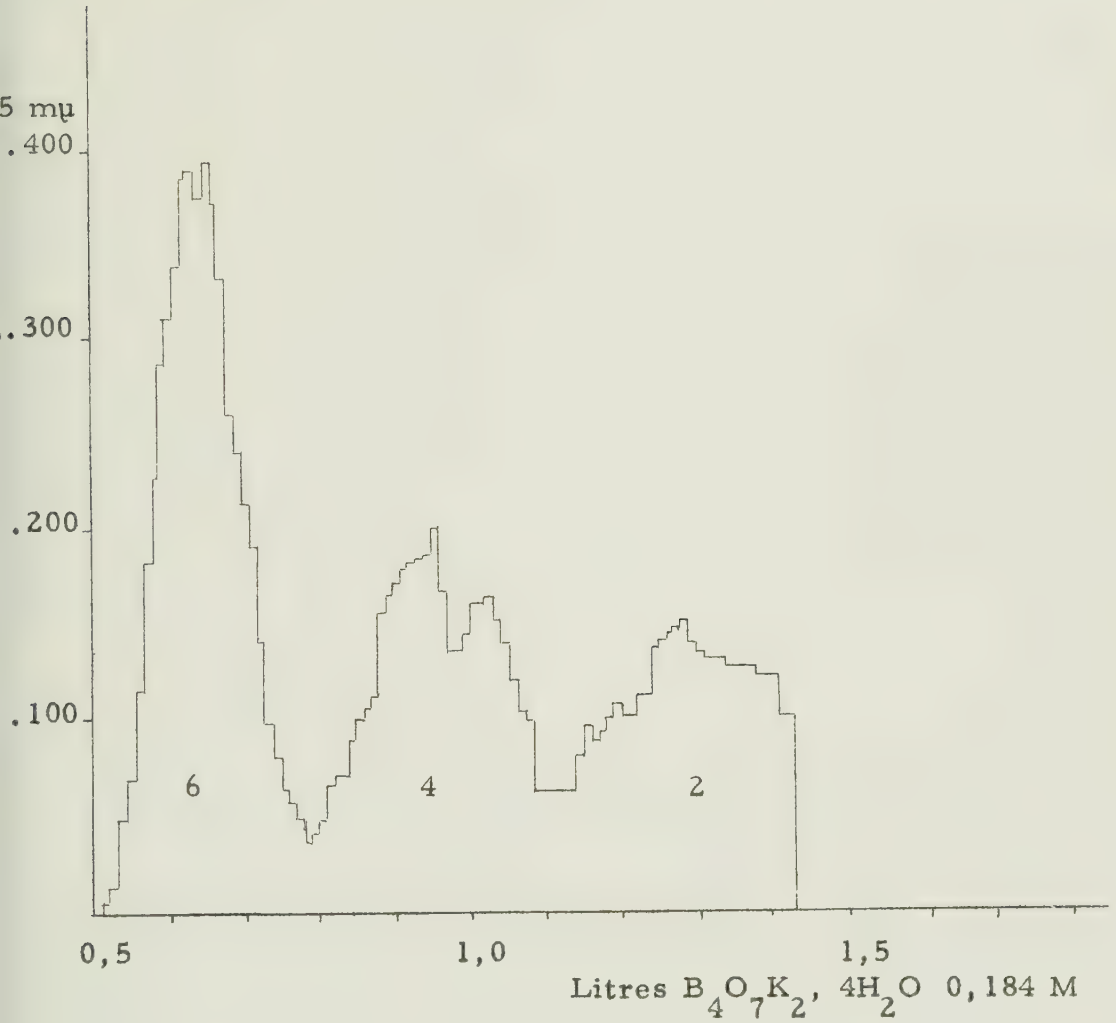
Position d'élution du phényl-β-D-glucoside 3 phosphate sur une colonne de Dowex 1 x2

La même colonne qui nous a servi à séparer les phényl-β-D-glucosides 4 et 6 phosphate est préparée comme il est indiqué dans le chapitre des méthodes générales. Comme éluant, on emploie une solution de tétraborate de potassium 0,248 M. On collecte des fractions de 10 ml à raison de 2 à 3 par heure.



9° SEPARATION DES PHENYL-β-D-GLUCOSIDES 2,4-et 6-PHOSPHATE SUR RESINE ECHANGEUSE D'IONS.

Une colonne de Dowex 1 x 2 est préparée comme il a été décrit dans le chapitre des "Méthodes Générales". On prépare un mélange de 10 mg. de chaque phosphate de sucre et le dissout dans 10 ml de borate 0,0186M pour l'adsorber sur la colonne. Comme éluant, on emploie une solution de borate 0,186M et collecte des fractions de 10 ml à raison d'une fraction par demi-heure. On obtient la courbe de séparation suivante.


5 mμ
.400
.300
.200
.100
6
4
2
0,5
1,0
1,5
Litres $B_4O_7K_2$, $4H_2O$ 0,184 M

CHAPITRE III

1° SYNTHESE DU PHENYL-β-D-GALACTOSIDE 4,6-PHOSPHATE

A. Préparation du penta-0-acétyl-β-D-galactose

Dans un ballon de 500 ml muni d'un réfrigérant ascendant 20 g. de galactose et 10 g. d'acétate de sodium fondu sont mis en suspension dans 100 ml d'anhydride acétique. On chauffe le tout avec précaution sur bain-marie jusqu'au départ de la réaction qui est assez vive. On retire le ballon du bain-marie jusqu'à ce que la réaction soit calmée, puis on chauffe le tout 10 minutes encore. L'acide acétique et l'anhydride acétique sont distillés sous pression réduite et le résidu est précipité dans l'eau glacée sous une agitation violente que l'on poursuit pendant, une heure ou deux. On filtre et l'on recristallise le précipité dans de l'éthanol. La préparation a été effectuée sur une échelle de 400 g. de galactose.

Point de fusion : 142°

Rendement : 60 %

B. Préparation du phényl 2,3,4,6-tétra-0-acétyl-β-D-galactoside

Dans un ballon de 150 ml sont placés 50 g. de phénol et 0,1 g. d'acide p-toluène sulfonique ; on chauffe le tout sur bain-marie jusqu'à fusion complète, on ajoute alors 50 g. de pentaacétyl-galactose ; on plonge ensuite le ballon dans un bain-marie bouillant et le relie à une trompe à vide pour évacuer l'acide acétique formé. On maintient la température à 100°, pendant 3 heures et demie à 4 heures. La masse fondue se colore en brun rougeâtre. On refroidit rapidement le ballon et dissout le résidu dans 150 ml de benzène. On lave le benzène 5 ou 6 fois avec de l'hydroxyde de sodium à 10 % glacé (500 ml environ) jusqu'à ce que la dernière extraction soit incolore.

Ensuite on lave la solution jusqu'à neutralité avec de l'eau froide, on la sèche sur du sulfate de sodium et on distille la chloroforme sous pression réduite. Le résidu, parfois cristallin, est recristallisé dans du tétrachlorure de carbone (250 ml pour 100 g. de pentaacétyl galactose).

Point de fusion : 128° - 129°

$[\alpha]_D^{20} = -0,75$ (c = 2 dans le chloroforme)

C. Désacétylation du phényl 2,3,4,6-tétra-O-acétyl-β-D-galactoside

1) Avec de l'ammoniac

On sature d'ammoniac une solution de 25 g. de phényl tétraacétyl-β-D-galactoside dans 350 ml de méthanol anhydre et maintient le mélange pendant 36 heures à 0°. On chasse alors l'ammoniac et le méthanol sous vide et obtient un précipité blanc que l'on recristallise dans la méthyl-isobutyl-cétone, ou dans le n-propanol

Rendement : 30 %

Point de fusion : 157°

Rf dans AcOH : ButOH : H_2O = 1 : 4:5 = 0,73

$[\alpha]_D^{20} = 42,5$ (C = 3 dans l'eau)

2) Méthode de Zemplén

34 g. de phényl tétraacétyl-β-D-galactoside sont dissous à chaud dans 200 ml de méthanol anhydre. Quand la solution est refroidie on ajoute 10 ml de méthoxyde de sodium N/10. et laisse le mélange réactionnel à la température ambiante : la solution brunit fortement, puis s'éclaircit au bout de 48 heures. (La réaction peut être accélérée par chauffage). On élimine les ions sodium avec de l'IR 120 sous forme acide, on filtre, chasse le méthanol par distillation sous vide et recristallise plusieurs fois le résidu dans de l'isobutyl-méthyl-cétone (6 ml de cétone pour 1 g. de précipité), ou dans le n-propanol

Rendement 50 %

3)Méthode de LEABACK

A 4,5 g. de phényl tétraacétyl-β-D-galactoside en suspension dans 5 ml de méthanol anhydre, on ajoute 0,5 ml de méthoxyde de sodium. La mixture est agitée jusqu'à dissolution totale. Après un repos de 18 heures à 5°, on élimine les ions Na avec de la résine IR 120 en forme acide, puis chasse le méthanol par distillation sous vide et recristallise le produit dans le propanol normal.

Rendement :60 %

D. Préparation du phényl-β-D-galactoside-4,6-(phényl phosphate)

On opère dans un ballon à trois cols ; l'un muni d'une ampoule à brôme l'autre d'un thermomètre, le troisième d'une protection de silice. Dans 300 ml de pyridine anhydre, on dissout 21 g. de phényl-β-D-galactoside séché au préalable sous vide pendant 2 à 3 heures à 60° sur pentoxyde de phosphore. On ajoute alors lentement 17 g. dichloro-phényl phosphate en solution dans 60 ml. de pyridine anhydre. On évite que la température ne dépasse 40 °. L'adjonction de l'agent phosphorylant requiert environ trente minutes. Puis on abandonne le ballon toute la nuit à la température ambiante. Le lendemain, on ajoute 10 ml. d'eau pour hydrolyser l'excès de dichloro-phényl phosphate et attend environ deux heures. On distille le plus de pyridine possible sous pression réduite et triture le résidu huileux avec de l'eau jusqu'à ne plus percevoir l'odeur de pyridine ; le résidu devient granuleux, on le filtre, le sèche et le recristallise dans de l'acide acétique.

Rendement : 29 g. soit 89 %

Point de fusion : 224° -225°

$\left[\alpha\right]_D^{25}$ = -41° (C= 1 dans la pyridine)

Analyse $C_{18}H_{19}O_8P$ P.M. = 394

Taux calculés	Taux trouvés
C = 54,42 %	C = 54,80 %
H = 4,97 %	H = 4,80 %

E. Préparation du phényl-β-D-galactoside-4,6-phosphate

4 g. de phényl-β-D-galactoside-4,6-phényl phosphate sont dissous dans 40 ml. de dioxane. On y verse ensuite une solution de 4,2 g. d'hydroxyde de potassium dans 10 ml. d'eau. La normalité de la solution finale est alors 1,5 N. en KOH. On agite ce mélange 12 heures durant. On homogénéise la solution en ajoutant une quantité suffisante d'eau, ramène le pH à 4 par de l'IR. 120 en forme acide et chasse le dioxane par distillation sous pression réduite en maintenant la température à moins de 30°. On élimine le phénol formé par plusieurs lavages de la solution aqueuse à l'éther éthylique dont on élimine les dernières traces sous vide. La solution est passée ensuite sur une colonne d'IR. 120 en forme de cyclohexylamine que l'on lave avec 5 fois son volume d'eau. On concentre les effluents et recristallise le résidu sec obtenu dans de l'éthanol à 95 %.

Rendement : 1,2 g. soit 28 %

Point de fusion : 230°

Rf dans le solvant A : 0,60

$\left[\alpha\right]_D^{25°}$ = - 59° (C = 0,512 dans l'eau)

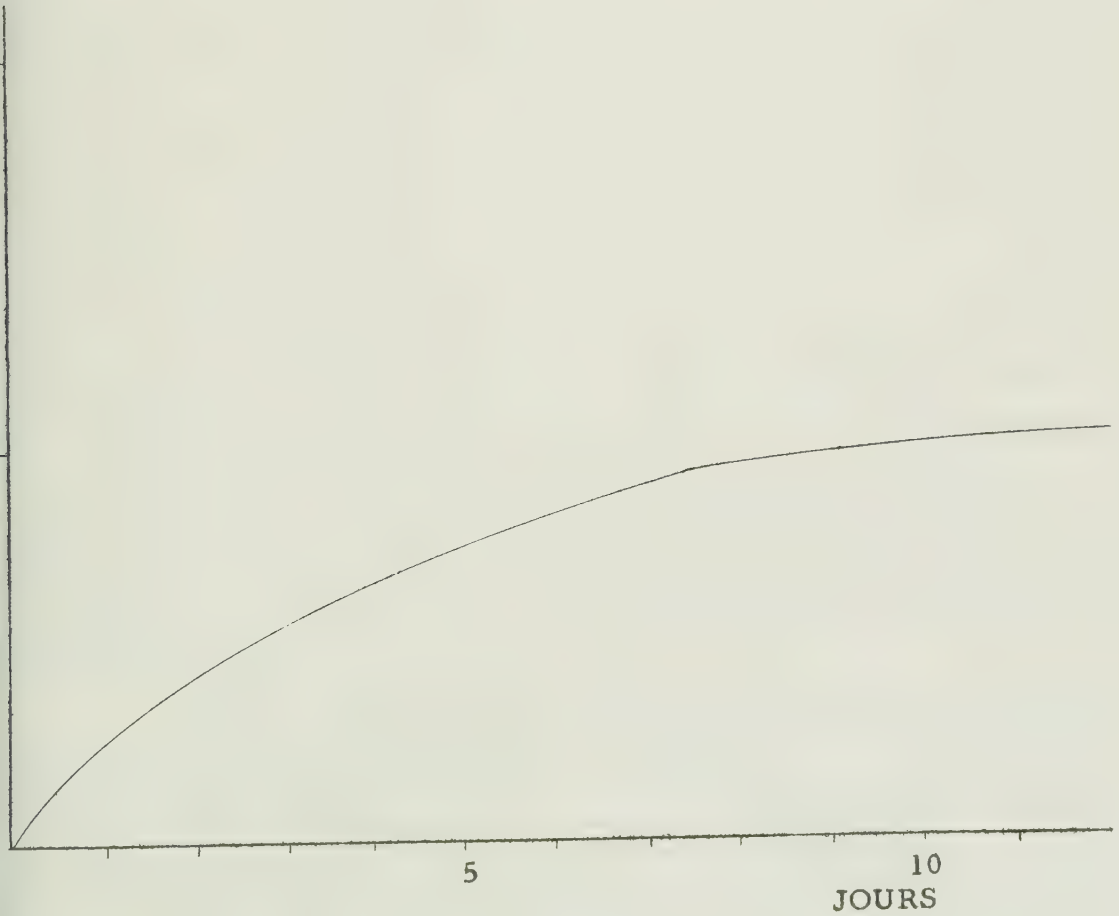
$\left[\alpha\right]_D^{25°}$ = - 59° (C = 0,512 dans une solution de tétraborate de potassium 0,372 M)

Analyse : $C_{18}H_{28}O_8N\ P,H_2O$ P.M. = 435

Taux calculés	Taux trouvés
C = 49,65 %	C = 49,81 %
H = 6,90 %	H = 6,98 %
N = 3,22 %	N = 3,50 %
P = 7,13 %	P = 7,68 %

Une titration potentiométrique de cette substance montre deux dissociations acides.

Cette substance consomme un équivalent de périodate en plus d'une semaine, comme le montre la courbe ci-dessous :



Les eaux-mères de cette préparation contenant, outre le phosphate cyclique, des monophosphates sont amenées à siccité par distillation sous-vide et le résidu sec obtenu traité comme indiqué ci-dessous.

2°. SEPARATION DES PHENYL-GALACTOSIDES MONOPHOSPHATES DU PHENYL-β-D-GALACTOSIDE-4,6-PHOSPHATE CYCLIQUE SUR COLONNE CHROMAX.

Nous avons employé une colonne "Chromax" L.K.B. modèle 3501 avec comme solvant un mélange propanol : ammoniaque : eau= 7:1:2.

La pression du manteau de caoutchouc était 1 kg., le volume de saturation du rouleau de papier de 130 ml. On a placé 500 mg. de mélange des sels de cyclohexylamine au sommet de la colonne. Il a fallu 5 heures 30 pour que le front du solvant arrive au bas de la colonne, le débit étant réglé à 20 ml. par heure. Le phényl-β-D-galactoside-4,6-phosphate est sorti à 180 ml de solvant ; les monophosphates à 230 ml.

Les effluents sélectionnés ont été débarrassés par traitement avec du noir animal d'un peu de cellulose dégradée provenant du rouleau de papier et ils ont été concentrés sous pression réduite à un faible volume. On acidifie alors la solution avec de l'IR 120, filtre et la neutralise avec de la cyclohexylamine à pH 7. En chassant le solvant, on obtient 100 mg. de phosphate cyclique et environ 350mg. de monophosphates.

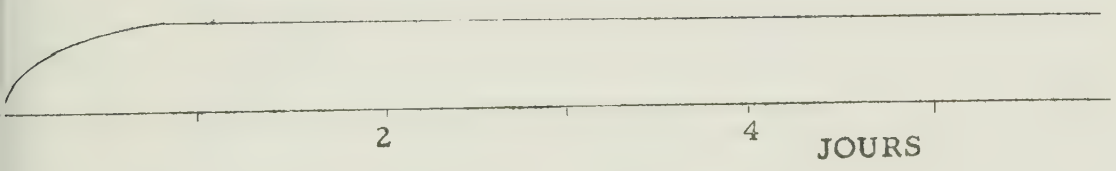
Analyse ; Calculée pour le phényl hexoside monophosphate sel acide de cyclohexylammonium : $C_{18}H_{30}O_9NP$ P.M. = 435

Taux calculés	Taux trouvés
C = 49,65 %	C = 49,43 %

H = 6,90 %	H = 7,09 %
N = 3,22 %	N = 3,68 %
P = 7,13 %	P = 6,84 %

Une titration popentiométrique met en évidence deux dissociation acides .

Ce produit ne consomme qu'un quart d'équivalent de périodate comme le montre la courbe ci-dessous :



Nous avons également employé pour cette séparation une colonne de Chromax L. K.B. modèle 3504 dans les conditions suivantes :

Pression intérieure du manteau : 500 g.

Volume de saturation du rouleau de papier : 500 ml

Nous avons adsorbé 3 g. de mélange et recueilli des fractions de 10 ml à raison d'une fraction par 1/4 d'heure. Nous avons traité les effluents comme il a été décrit plus haut et obtenu 1,9 g. de mono-phosphates.

3° HYDROLYSE ALCALINE DU PHENYL-β-D-GALACTOSIDE-4,6-PHOSPHATE

Un gramme de sel cyclohexylamine du phényl-β-D-galactoside-4,6-phosphate est dissous dans 25 ml de baryte 0,5 N. On chauffe la solution trois heures et demie sur un bain-marie bouillant. Au bout de ce temps, l'hydrolyse du phosphate cyclique n'est pas encore totalement terminée, mais si on prolonge l'ébullition, il se forme une quantité appréciable de phosphate inorganique.

On refroidit alors la solution, l'acidifie par de l'IR 120 en forme acide, la filtre et la neutralise par de la cyclohexylamine jusqu'à pH 7. Par distillation sous pression réduite on élimine l'eau et utilise le résidu pour la séparation suivante.

A. Séparation du phényl-β-D-galactoside 6 phosphate du phényl-D-galactoside 4 phosphate sur colonne "Chromax"

Nous avons employé pour cette séparation une colonne "Chromax" L.K.B. du type 3501 dans les conditions suivantes :

- Solvant : propanol: ammoniaque : eau = 7 : 1 : 2
- Pression intérieure du manteau égale à la pression atmosphérique.
- Volume de saturation du rouleau de papier : 130-150 ml.

Nous avons placé 800 mg. du mélange des sels de cyclohexylamine des monophosphates obtenus dans la préparation précédente et collecté des fractions de 5 ml à raison de deux fractions par heure. Les fractions contenant les différents monophosphates ont été sélectionnées et concentrées sous vide. Après un traitement avec du noir animal pour éliminer un peu de cellulose dégradée, on acidifie les solutions avec de l'IR 120 ; celle du phényl galactoside 6 phosphate est neutralisée avec de la cyclohexylamine (Rendement : 16 %) ; celle du 4 phos-

phate avec de la baryte (rendement : 55 %).

a) constantes physiques du phényl-β-D-galactoside 6 phosphate de cyclohexylamine

Point de fusion : 165°

Rf dans le solvant A : 0,29

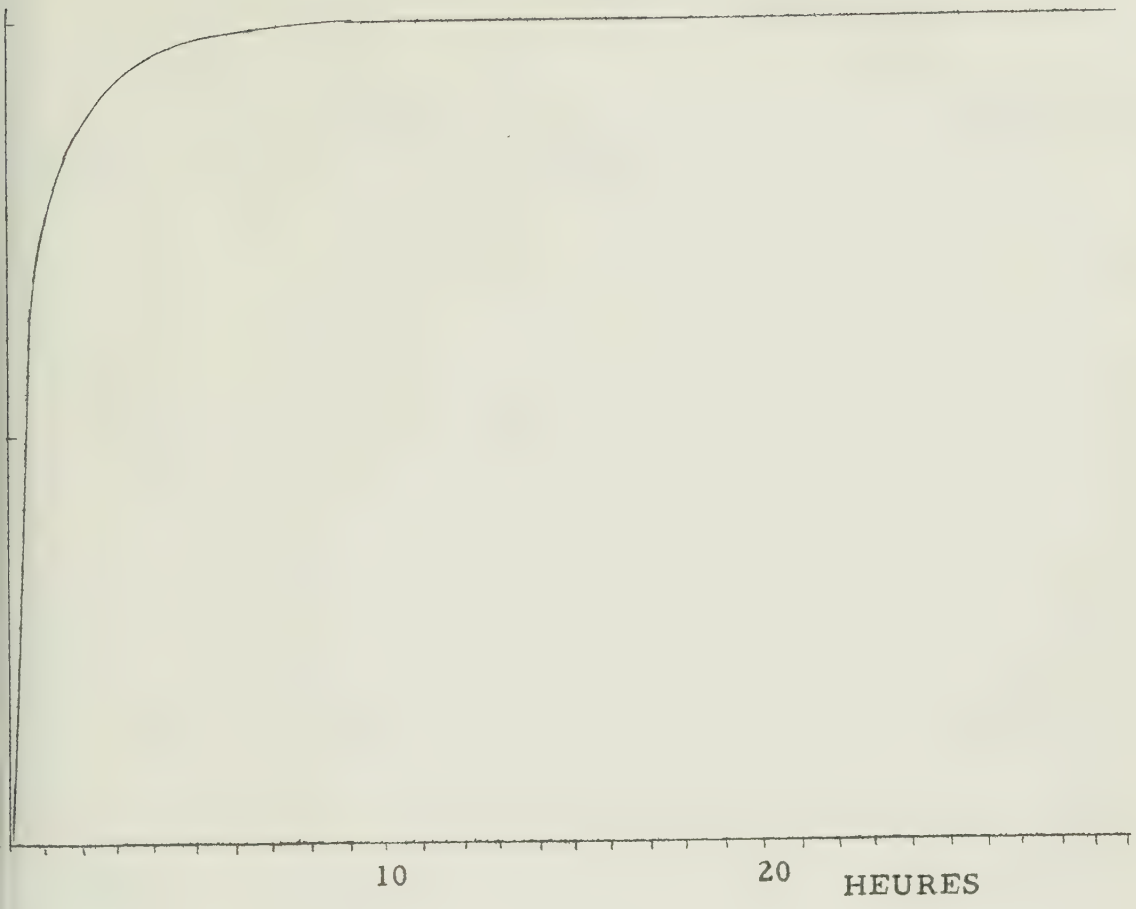
$[\alpha]_D^{20,9°} = -41,5°$ (c = 1 dans l'eau)

$[\alpha]_D^{20,9°} = -55,5°$ (c = 1 dans une solution de tétraborate de potassium 0,372 M)

Analyse : $C_{24}H_{43}O_9N_2P$, H_2O P.M. = 552

Taux calculés	Taux trouvés
C = 52,16 %	C = 52,07 %
H = 8,20 %	H = 7,91 %
N = 5,07 %	N = 5,06 %
P = 5,61 %	P = 5,61 %

Le phényl-β-D-galactoside 6 phosphate consomme deux équivalents de périodate, ainsi que le révèle la courbe ci-dessous:



b) constantes physiques du phényl-β-D-galactoside 4 phosphate, sel de Baryum

Rf dans le solvant A : 0,40

$[\alpha]_D^{20} = -29°$ (C = 1 dans l'eau)

$[\alpha]_D^{20} = -30°$ (C = 1 dans une solution de tétraborate de potassium 0,372 M)

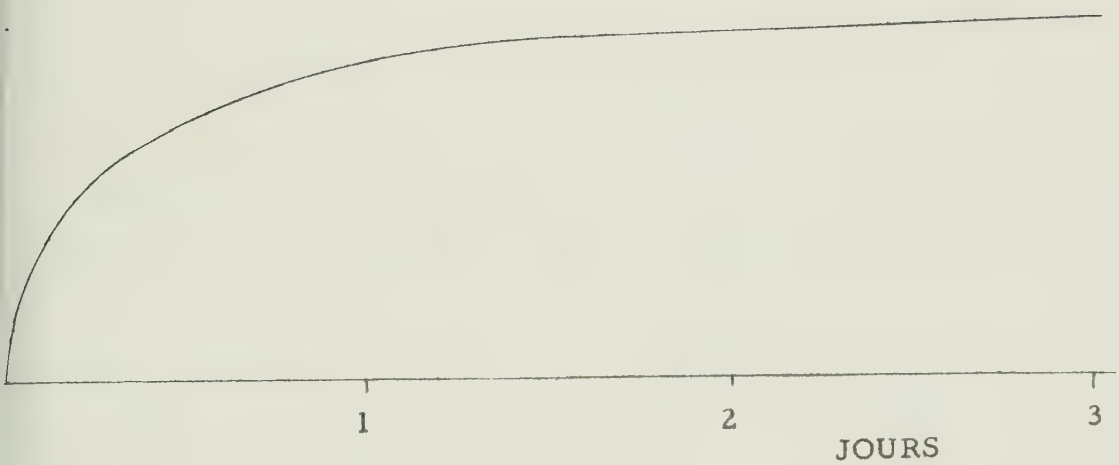
Analyse : $C_{12}H_{15}O_9 P Ba , 2H_2O$ P.M. = 507

Taux calculés	Taux trouvés
C = 28,40 %	C = 28,68 %

H = 3,35 % H = 3,46 %

Ba =27,00 % Ba = 26,90 %

Le phényl galactoside 4 phosphate consomme lentement un équivalent de periodate comme l'indique la courbe ci-dessous :



B. Détermination des quantités relatives du phényl-β-D-galactoside 4 phosphate et du phényl-β-D-galactoside 6 phosphate

1) Par chromatographie sur papier

Pour déterminer les quantités relatives de phényl-β-D-galactoside 4 phosphate et de phényl-β-D-galactoside 6 phosphate, nous avons employé la méthode de chromatographie élutive décrite

dans le cas des phényl-β-D-glucosides 4 et 6 phosphate. Nous avons trouvé qu'il y avait 3 fois plus de 4 phosphate que de 6 phosphate.

2) Par analyse sur résine

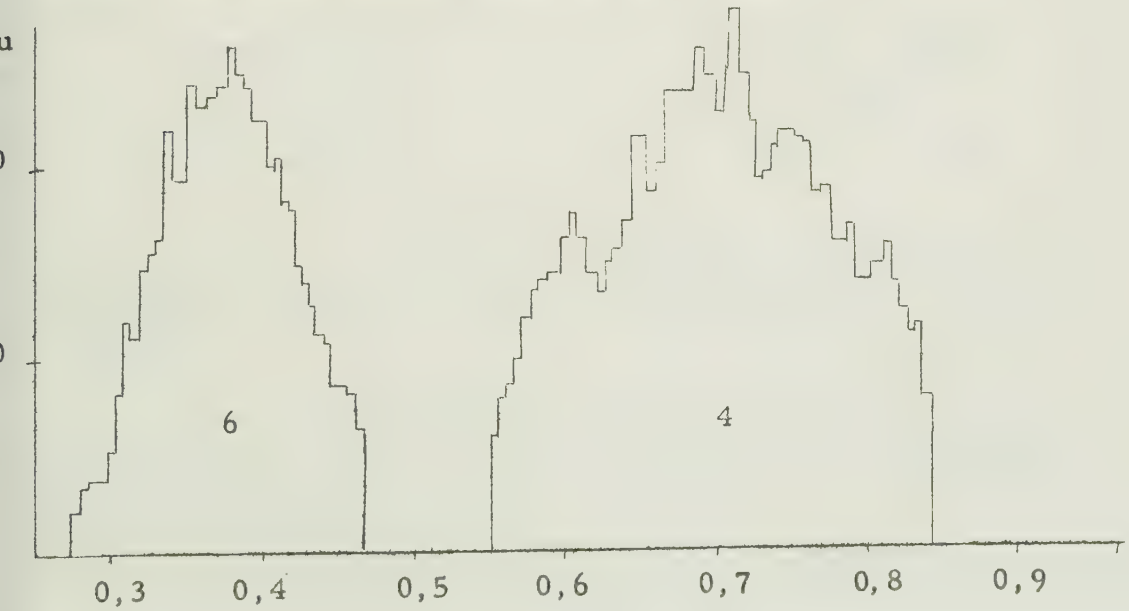
Nous avons utilisé pour cette détermination une colonne de Dowex 2 . en forme de monochloracétate préparée comme nous l'avons indiqué dans le chapitre des méthodes générales.

La colonne de résine avait une hauteur de 42 cm. pour un diamètre de 1,4 cm. L'éluant était une solution 0,125 N de monochloracétate de sodium et 0,05 N d'acide monochloracétique. Nous avons recueilli des fractions de 5 ml à raison de 4 à 5 par heure.

Auparavant, nous avions établi la position d'élution des phényl-β-D-galactosides 4 et 6 phosphate en utilisant les substances pures.

Le phényl-β-D-galactoside 6 phosphate s'élue entre 300 et 500 ml et le 4 phosphate entre 550 et 850 ml d'effluent..

Quand nous avons placé le mélange réactionnel provenant de l'hydrolyse alcaline du phényl-β-D-galactoside-4,6-phosphate cyclique, nous avons obtenu la courbe de séparation ci-dessous :



L. $ClCH_2COONa$ 0,125 N, $ClCH_2COOH$ 0,05 N

Il en ressort qu'il y a 3 fois plus de phényl-β-D-galactoside 4 phosphate que de 6 phosphate dans l'hydrolysat.

4. PREPARATION DU PHENYL-β-D-GALACTOSIDE 2 PHOSPHATE

A. Préparation du phenyl-4,6-benzylidène-β-D-galactoside

Dans un flacon d'un litre, on suspend 20 g. de phényl-β-D-galactoside dans 80 g. d'aldéhyde benzoïque fraîchement distillé ; on y verse rapidement 25 à 30 g. de chlorure de zinc fondu pulvérisé et fait agiter le flacon toute la nuit . Le lendemain, on reprend plusieurs fois le précipité gélatineux dans du pentane sous une forte agitation (3 ou 4 fois 100 ml) pour éliminer l'excès d'aldéhyde benzoïque. On essore entre chaque lavage le précipité, puis on répète les lavages dans les mêmes conditions avec de l'eau glacée pour éliminer le chlorure de zinc. On recristallise le précipité dans du dioxane.

Point de fusion 242°

$[\alpha]_D^{24,7°} = -74°$ (C = 1,03 dans la pyridine)

Analyse : $C_{19}H_{20}O_6$, H_2O P.M. = 362

Taux calculés	Taux trouvés
C = 62,98 %	C = 63,00 %
H = 6,07 %	H = 6,14 %

B. Préparation du phényl-4,6-benzylidène-3-0-benzoly-β-D-galactoside

La verrerie employée dans cette préparation doit être parfaitement sèche et les ouvertures en contact avec l'air protégées de l'humidité par du gel de silice.

Dans un ballon de 50 ml, 10 g. de phényl-4,6-benzylidène-β-D-galactoside très sec sont dissous dans 10 ml de pyridine anhydre.

On refroidit à -15° le ballon dans un mélange glace-sel et ajoute très lentement une solution de 4,05 g. de chlorure de benzoyle fraîchement distillé dans 50 ml de pyridine anhydre. L'addition demande une heure environ et la température ne doit pas dépasser -2°. On laisse ensuite la solution 48 heures à 0°.

On verse alors le mélange réactionnel dans 500 ml d'eau glacée en maintenant une agitation assez vive pendant quelques temps. On extrait le composé avec 100 ml de chloroforme en plusieurs temps. Pour éliminer les traces de pyridine, on lave plusieurs fois avec de l'acide sulfurique à 1 % v/v en évitant d'atteindre un pH trop acide. On lave ensuite le chloroforme à l'eau et le sèche sur du sulfate de sodium. Le chloroforme est ensuite chassé sous pression réduite et on obtient un résidu cristallin que l'on peut recristalliser dans de l'éthanol.

Rendement : 6,5 g.

Point de fusion : 210°-213°

Le produit est un mélange de phényl monobenzoyl-β-D-galactoside et de substance de départ.

C. Séparation du phényl-4,6-benzylidène-3-O-benzoyl-β-D-galactoside du phényl-4,6-benzylidène-β-D-galactoside

On prépare une colonne en versant lentement 180 g. d'alumine activée dans une solution de 36 ml d'acétate d'éthyle dans 60 ml de benzène. On fait adsorber par l'alumine 6 g. du produit obtenu précédemment et dissous dans un mélange benzène-acétate d'éthyle 5 pour 3. Quand 300 ml de cette solution sont passés, le phényl-4,6-benzylidène 3 benzoyl-galactoside est élué. On le recristallise dans l'éthanol.

Rendement : 3,90 g. soit 30 %

Point de fusion : 220°

$[\alpha]_D^{24°}$ = + 72° (C = 1,04 dans la pyridine)

Analyse : $C_{26}H_{24}O_7$	P.M. = 448
Taux calculés	Taux trouvés
C = 69,64 %	C = 69,45 %
H = 5,35 %	H = 5,35 %

La substance présente aux rayons infra-rouges une bande d'absorption dans la zone de 3600 cm^{-1} correspondant à la vibration du groupement hydroxyle.

D. Phényl-4,6-benzylidène-3-0-benzoyl-β-D-galactoside 2 phosphate

On opère dans un ballon de 50 ml. Dans 10 ml de pyridine anhydre, on dissout 1 g. de phényl-4,6-benzylidène-3-0-benzoyl-β-D-galactoside séché au préalable pendant trois heures à 100° sur du pentoxyde de phosphore. On refroidit la solution à 50° dans un bain de CO_2/acétone et y ajoute 325 mg. d'oxychlorure ; de phosphore en solution dans 5 ml de pyridine anhydre. On laisse la température remonter lentement jusqu'à atteindre celle ambiante à laquelle on maintient la solution une nuit. On ajoute alors quelques ml d'eau pour neutraliser l'excès d'oxychlorure de phosphore et distille sous pression réduite le plus de pyridine possible. On reprend le sirop résiduel dans du chloroforme (20 ml)que l'on lave à l'eau jusqu'à disparition des ions chlorures, puis une fois avec 10 ml d'acide sulfurique à 1 % v/v et ensuite deux ou trois fois avec de l'eau.

On sèche le chloroforme et l'élimine par distillation à pression réduite. Le résidu, parfois cristallin, est utilisé tout de suite pour la préparation suivante.

E. Phényl-3-O-benzoyl-β-D-galactoside 2 phosphate

On dissout le produit précédent dans 50 ml d'éthanol et amène

le pH à 3 avec de l'IR 120 en forme acide et l'on filtre. Pendant 3 heures, la solution est maintenue sous reflux ; puis, on neutralise la solution avec de la cyclohexylamine et la concentre jusqu'à sec. On sèche le résidu quelques heures sous vide sur du pentoxyde de phosphore.

F. Phényl-β-D-galactoside 2 phosphate

On reprend le résidu précédent dans du méthanol anhydre (20 ml environ) et y ajoute 3 ml de méthoxyde de sodium 2 N. On laisse le mélange réactionnel dans la chambre froide pendant 24 heures.

Avec de l'IR 120 en forme acide, on élimine les ions sodium et réajuste le pH à 7 avec de la cyclohexylamine. On concentre sous pression réduite la solution et recristallise le résidu dans de l'éthanol.

Rendement : 200 mg. soit 10 %

Point de fusion : 133° - 135°

Rf dans le solvant A : 0,33

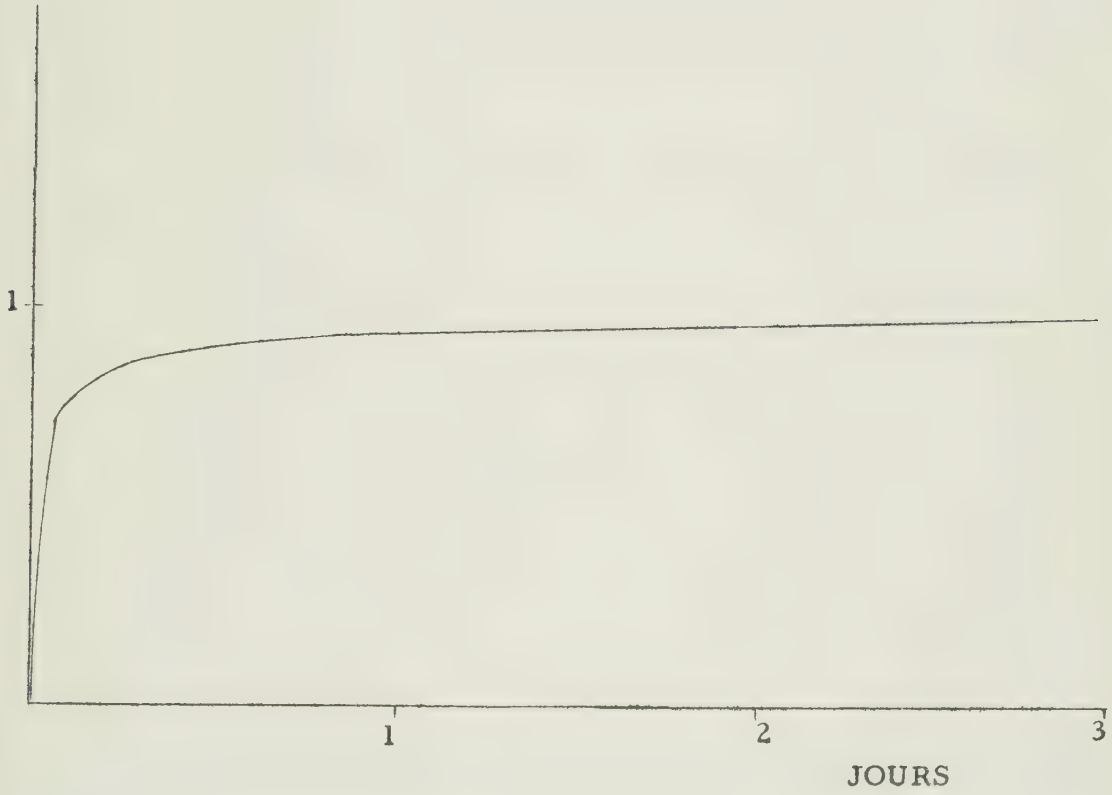
$$\left[\alpha\right]_D^{25,5^\circ} = -20,5^\circ \text{ (C= 1 dans l'eau)}$$

$$\left[\alpha\right]_D^{25} = -36^\circ \text{ (C = 1 dans une solution de tétraborate de potassium 0,372 M)}$$

Analyse : $C_{24}H_{43}O_9N_2P$, H_2O P.M. = 552

Taux calculés	Taux trouvés
C = 52,16 %	C = 52,57 %
H = 8,20 %	H = 8,04 %
N = 5,07 %	N = 4,91 %
P = 5,61 %	P = 5,20 %

Le phényl-β- D-galactoside 2 phosphate consomme un équivalent de périodate comme le montre la courbe de titrage ci-dessous:



5°. PREPARATION DU PHENYL-β-D-GALACTOSIDE 3 PHOSPHATE

A. Préparation du phényl-4,6-benzylidène-β-D-galactoside-2,3-phényl phosphate

Dans 25 ml de pyridine anhydre, on dissout 5 g. de phényl-4,6-benzylidène-β-D-galactoside et ajoute très lentement à cette solution 3,10 g. de dichlorophénylphosphate en solution dans 10 ml de

pyridine anhydre. Le mélange réactionnel est maintenu 18 heures à la température ambiante. On ajoute alors un peu d'eau pour hydrolyser l'excès d'agent phosphorylant et attend une demi-heure avant de distiller à pression réduite l'excès de pyridine. On reprend le résidu dans du chloroforme et lave la solution obtenue plusieurs fois avec de l'acide sulfurique à 1 % v/v et ensuite avec de l'eau. On sèche le chloroforme sur du sulfate de sodium avant de l'éliminer par distillation sous pression réduite.

On recristallise le résidu dans de l'éthanol et obtient 6 g. de produit.

Rendement : 90 %

Point de fusion : 164° -165°

$[\alpha]_D^{26,5°} = +7,50°$ (C = 1 dans la pyridine)

Analyse : $C_{25}H_{23}O_8P$ P.M. = 482

Taux calculés	Taux trouvés
C = 62,50 %	C = 62,20 %
H = 4,77 %	H = 4,76 %
P = 6,44 %	P = 6,44 %

B. Préparation du phényl-4,6-benzylidène-β-D-galactoside 3 -phosphate

Six grammes du produit précédent sont dissous dans 40 ml de dioxanne auquel on ajoute 10 ml d'une solution d'hydroxyde de potassium à 42 %. Une nuit durant, on maintient le mélange réactionnel sous une forte agitation.

Le lendemain, on acidifie la solution avec de l'IR 120 en forme acide. On élimine la résine par filtration et neutralise la solution par de la cyclohexylamine. On chasse alors le dioxanne sous pression réduite en vérifiant de temps en temps le pH que l'on ramène à 7 au besoin. Quand le résidu est presque sec, on le redissout à

chaud dans très peu d'éthanol ; on le précipite avec de l'éther éthylique et le triture dans ce solvant en le refroidissant dans un bain carbo-glace/acétone avant de le décanter. On répète cette opération plusieurs fois et en élimine ainsi le phénol formé dans la réaction précédente.

Quand, dans l'éther de lavage, on ne perçoit plus l'odeur de phénol, on évapore les dernières traces d'éther et on obtient un résidu sirupeux que l'on a pu recristalliser dans un mélange acétone-éthanol.

Rendement : 4,2 g.

Point de fusion : 193°

$[\alpha]_D^{26°} = -24°$ (C = 0,340 dans le méthanol)

Analyse : sel acide de cyclohexylamine du phényl-4,6-benzylidène-β-D-galactoside 3 phosphate :

$C_{25}H_{34}O_9NP$, $1H_2O$ P. M. = 541

Taux calculés	Taux trouvés
C = 55,49 %	C = 55,84 %
H = 6,66 %	H = 6,53 %
N = 2,58 %	N = 2,72 %
P = 5,72 %	P = 5,96 %

C. Préparation du phényl-β-D-galactoside 3 phosphate

On dissout le corps précédent(4 g.) dans de l'hétanol et amène le pH à environ 2 avec de l'IR 120 en forme acide. On filtre la solution et on la maintient sous reflux pendant une demi-heure à trois quarts d'heure. Puis à la solution refroidie, on ajoute de la cyclohexylamine jusqu'à pH 7. On distille l'éthanol et recristallise le résidu obtenu dans un mélange méthanol-éther éthylique.

Rendement : 1,3 g. soit 25 %

Point de fusion : 140°

Rf dans le solvant A = 0,38

$[\alpha]_D^{25,5°}$ = - 10,5° (C = 1 dans l'eau)

$[\alpha]_D^{25,5°}$ = - 15,5° (C = 1 dans une solution de tétraborate de potassium 0,372 M)

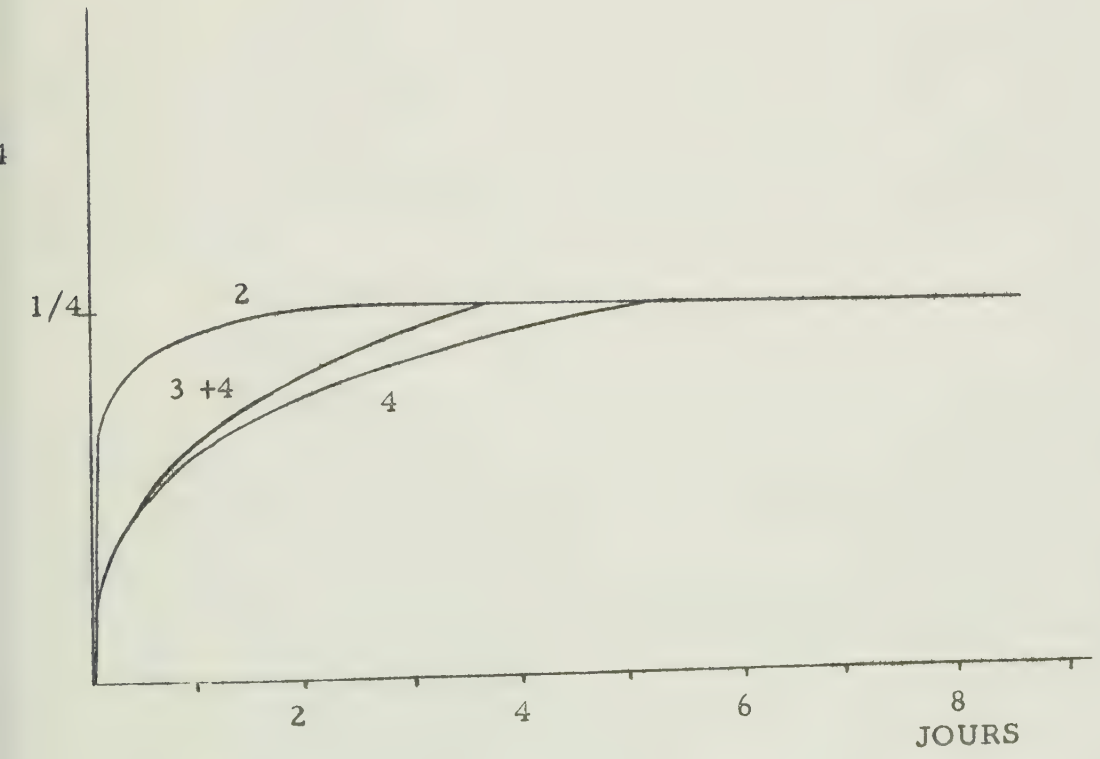
Analyse : $C_{24}H_{43}O_9N_2P$, I,5 H_2O P. M. = 561,63

Taux calculés	Taux trouvés
C = 51,32 %	C = 51;46 %
H = 8,25 %	H = 8,06 %
N = 4,98 %	N = 4,83 %
P = 5,52 %	P = 5,80 %

Cette substance ne consomme pas de périodate même après avoir été à son contact pendant une semaine.

Oxydation périodique comparée des phényl-β-D-galactosides 4 et 2 phosphate et des monophosphates du phényl-β-D-galactoside obtenus dans la préparation précédente.

On a pesé 1/4 d'équivalent en sucre de phényl-β-D-galactoside 4 et 2 phosphate et on les a oxydés séparément dans les mêmes conditions que le mélange des monophosphates obtenus pendant le traitement alcalin du phényl-β-D-galactoside 4,6 (phényl phosphate). On porte sur le même graphique les trois courbes de tritrage et on voit que la consommation de périodate du mélange des monophosphates est presque identique à celle du 4 phosphate, mais très différente de celle du 2 phosphate.



CHAPITRE IV

PREPARATION DU METHYL-α-D-GLUCOSIDE -4,6-PHENYL PHOSPHATE

A. Préparation du méthyl-α-D-glucoside

On fait passer un courant d'acide chlorhydrique sec dans 200 g. de méthanol anhydre en refroidissant le ballon dans la glace et en évitant tout contact avec l'humidité, jusqu'à une augmentation de poids de 5 g. On dilue cette solution par 1800 g. de méthanol. On obtient ainsi une solution à 0,25 % d'acide chlorhydrique. On y ajoute 500 g. de D-glucose anhydre finement pulvérisé et on fait refluer la solution pendant 72 heures. La dissolution est complète après 15 minutes d'ébullition.

On refroidit à 0° le mélange réactionnel jaune pâle et on amorce la cristallisation en ajoutant une trace de méthyl- -D-glucoside. Après 12 heures de repos à 0°, on filtre la solution. La première partie de cristaux obtenue est lavée deux fois avec 100 ml de méthanol glacé.

Rendement : 85 à 120 g.

Point de fusion : 165°

La liqueur mère et l'alcool de lavage sont remis dans le ballon et on les fait bouillir sous reflux de nouveau pendant 72 heures. Le liquide est concentré à 800 ml; on le refroidit à 0°, amorce la cristallisation et on abandonne le tout 24 heures à 0°. On filtre sous vide ; la seconde portion de glucoside ainsi obtenue est lavée trois fois avec 100 ml de méthanol glacé.

Rendement : 110-145 g.

Point de fusion : 164° -165°

On rassemble la liqueur mère et les liqueurs de lavage et on les concentre à 300 ml environ. On refroidit à 0°, amorce la cristallisation et abandonne le tout 24 heures à 0°. La masse cristalline résultante est diluée dans deux fois son poids de méthanol absolu, abandonnée 24 heures à 0° et filtrée. Les cristaux obtenus sont recristallisés dans 25 parties de méthanol.

Rendement : 30 - 36 g.

Point de fusion : 164° - 165°

Rendement total : 260 -266 g. soit 48,5 - 49,5 %

B. Préparation du méthyl-4,6-O-benzylidène-α-D-glucoside

A 28 g. de méthyl-α-D-glucoside très sec en suspension dans 70 ml d'aldéhyde benzoïque fraîchement distillé, on ajoute 21 g. de chlorure de zinc fondu pulvérisé. On laisse le flacon sous agitation toute la nuit. Le produit de réaction est lavé à l'éther de pétrole pour enlever l'excès d'aldéhyde benzoïque et ensuite à l'eau glacée pour éliminer le chlorure de zinc. On le reprend ensuite dans du chloroforme et on sèche la solution chloroformique sur du sulfate de sodium. Par addition d'éther, le méthyl-4,6-O-benzylidène-α-D-glucoside précipite.

Rendement : 25 g. soit 61,5 %

Point de fusion : 161° -162°

C. Préparation du méthyl-2,3-di-O-benzyl-4,6-0-benzylidène - α-D-glucoside

Dans un ballon muni d'un agitateur mécanique et d'une protection contre le gaz carbonique de l'atmosphère, on chauffe à 100° pendant 5 heures un mélange de 30 g. de méthyl benzylidène glucoside 25 g. de potasse caustique en poudre, 50 ml de chlorure de benzyle et de xylène sec. A la fin de ce temps, on refroidit le ballon, ajoute de

l'eau pour dissoudre la potasse et le chlorure de potassium formé et sépare la couche aqueuse de la couche organique. Cette dernière est concentrée sous pression réduite. Le résidu solide est essoré, lavé et recristallisé dans de l'éthanol aqueux.

Rendement : 34,5 g. soit 78 %

Point de fusion : 93°

D. Préparation du méthyl-2,3-di-O-benzyl-α-D-glucoside

On dissout 35 g. du produit précédent dans un mélange de 450 ml d'acétone, 100 ml d'eau et 30 ml d'acide chlorhydrique I N. et on fait refluer la solution pendant 5 heures. On neutralise ensuite par de l'IR 45 sous forme basique, filtre et chasse les solvants par distillation sous pression réduite. On triture le résidu avec un peu de pentane, essore les cristaux qui se forment, les redissout dans de l'ether éthylique et les recristallise par addition d'éther de pétrole.

Rendement : 18 g. soit 64 %

Point de fusion : 76°

E. Préparation du méthyl-2,3-di-O-benzyl-α-D-glucoside-4,6-phénylphosphate

Dans 100 ml de pyridine anhydre, on dissout 16 g. du produit précédent. En évitant de laisser la température dépasser 40°, on ajoute lentement une solution de 10,85 g. de phénylphosphorodichloridate dans 50 ml de pyridine. On laisse le mélange réactionnel à 37° pendant 48 heures sous la tension de vapeur du solvant. Puis, on le refroidit et on y ajoute un peu d'eau. Au bout de deux heures, on chasse les solvants par distillation à pression réduite et reprend le résidu dans du chloroforme. La couche chloroformique est lavée d'abord à l'eau glacée, puis avec une solution d'acide sulfurique à 1 % v/v et de nouveau à l'eau glacée. La solution chloroformique est séchée sur du sulfate de sodium et le

solvant chassé sous pression réduite. On redissout le résidu obtenu dans de l'éthanol ; par addition d'éther de pétrole, des cristaux se forment.

Rendement : 7,2 g. soit 40 %

Point de fusion : 141°-143°

$[\alpha]_D^{26,5°} = +50,5°$ (C = 1,00 dans le dioxanne)

$[\alpha]_D^{25°} = +24°$ (C = 1,00 dans le chloroforme)

F. Préparation du méthyl-α-D-glucoside4, 6-phénylphosphate

On dissout 7 g. de la substance précédente dans du méthanol et avec de l'oxyde de palladium comme catalyseur, on effectue une hydrogénolyse des groupes benzyles. On filtre l'éthanol quand la quantité prévue d'hydrogène est consommée. On distille le solvant à pression réduite et recristallise le résidu dans du méthanol.

Rendement 3,2 g. soit 70 %

Point de fusion ; 200°

$[\alpha]_D^{20°} = +100,8°$ (C = 1,23 dans l'éthanol)

G. Préparation du méthyl-α-D-glucoside-4,6-phosphate cyclique

On dissout dans 25 ml de dioxanne 3,2 g. de méthyl-α-D-glucoside-4,6-phénylphosphate. On ajoute à cette solution 5 ml d'une solution d'hydroxyde de potassium 9,2 N. On laisse agiter le mélange réactionnel hétérogène pendant toute une nuit. Le lendemain on homogénéise la solution par addition d'eau puis, avec de la résine IR 120 sous forme acide, on amène le pH à 4. Le dioxanne est chassé par distillation sous pression réduite, la solution aqueuse obtenue lavée plusieurs fois avec de l'éther pour élimer le phénol, puis l'éther résiduel évaporé sous vide. On acidifie la solution avec de l'IR 120 sous forme acide, la neutralise avec de la cyclohexylamine et la concentre

sous vide. On recristallise le résidu dans un mélange éthanol-éther.

Rendement : 508 mg soit 14 %

Point de fusion : 228° -230 ° ; R_f solvant A = 0,47

$[\alpha]_D^{20°} = + 83,1°$ (C = 1,13 dans l'eau)

Analyse : $C_{13}H_{26}O_8NP$ P.M. = 455

Taux calculés	Taux trouvés
C = 43,9 %	C = 44,2 %
H = 7,3 %	H = 7,6 %
N = 3,9 %	N = 4,0 %
P = 8,7 %	P = 8,4 %

Les eaux-mères de cette préparation sont concentrées jusqu'à sec et le produit utilisé pour l'obtention des monophosphates.

H. Séparation sur colonne "Chromax" du méthyl-α-D-glucoside-4,6 phosphate cyclique des monophosphates obtenus dans la réaction précédente

Nous avons effectué cette séparation sur la colonne du type 3501, opérant comme il est indiqué dans le chapitre des méthodes générales.

La pression intérieure du manteau de caoutchouc était d'une atmosphère et pour saturer le rouleau, il a fallu 150 ml de solvant.

Nous avons placé au sommet de la colonne 1 g. de mélange obtenu à partir des eaux-mères de la préparation précédente et nous avons recueilli des fractions de 5 ml à raison de 7 par heure. Le phosphate cyclique sort vers 270 ml et les monophosphates vers 340 ml d'effluent .

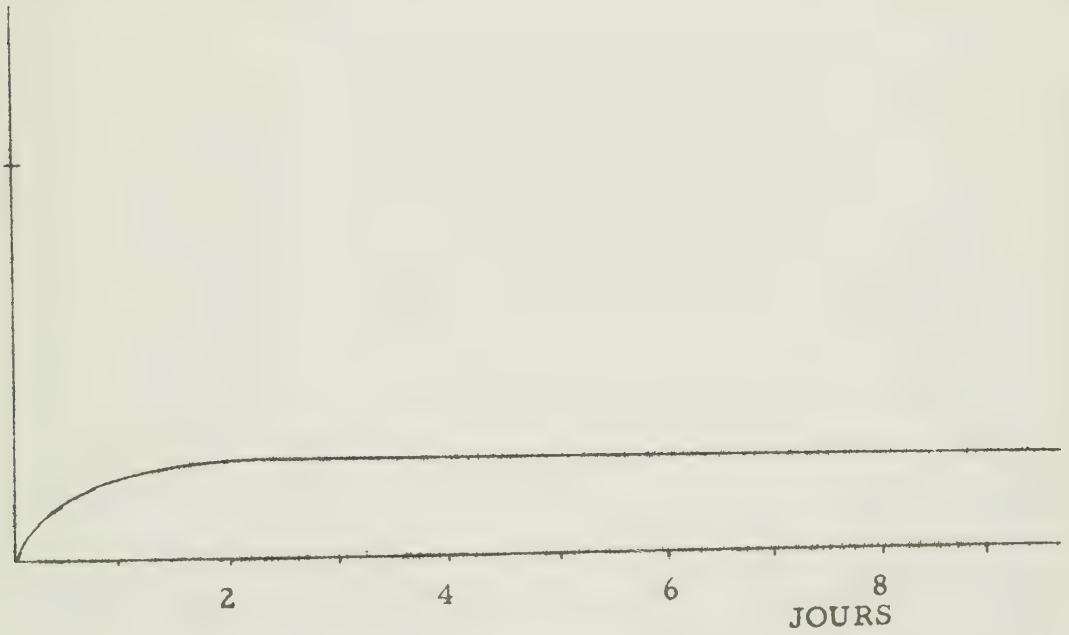
Nous avons rassemblé les fractions contenant les monophosphates et avons distillé le solvant à pression réduite. Nous avons recueilli 125 mg de mélange de monophosphates du méthyl-α-D-glucoside.

Nous avons concentré jusqu'à un faible volume les fractions contenant le phosphate cyclique. Par de la résine IR 120 en forme acide, nous avons acidifié la solution qui est ensuite filtrée et neutralisée directement avec de la cyclohexylamine jusqu'à pH 7.

Le solvant est chassé par distillation sous vide et le résidu recristallisé dans un mélange éthanol-éther. Nous avons obtenu de phosphate cyclique.

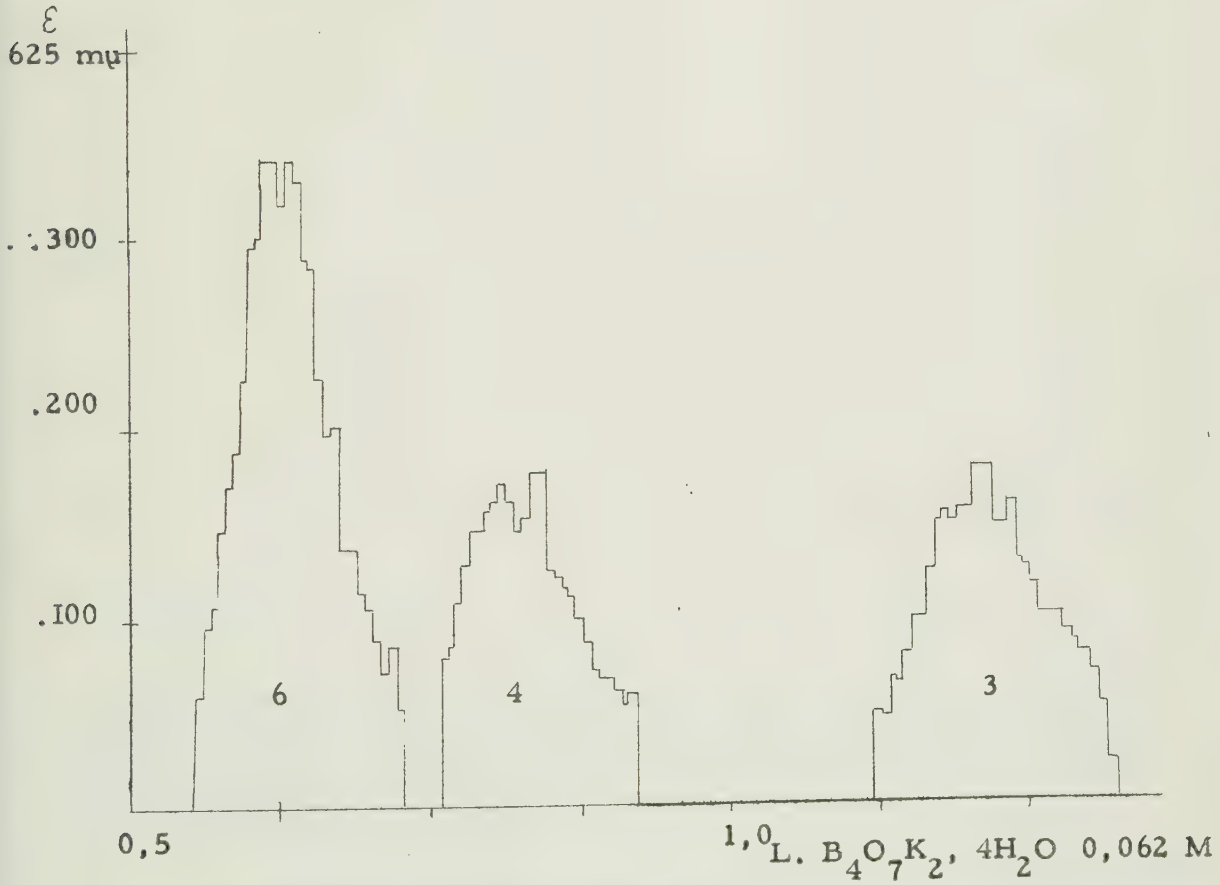
Rendement total en méthyl-α-D-glucoside-4,6-phosphate :

La portion des monophosphates du méthyl-α-D-glucoside consomme 1/4 d'équivalent de périodate comme l'indique la courbe ci-dessous.



1. Position d'élution des méthyl-α-D-glucosides 6,4 et 3 phosphate

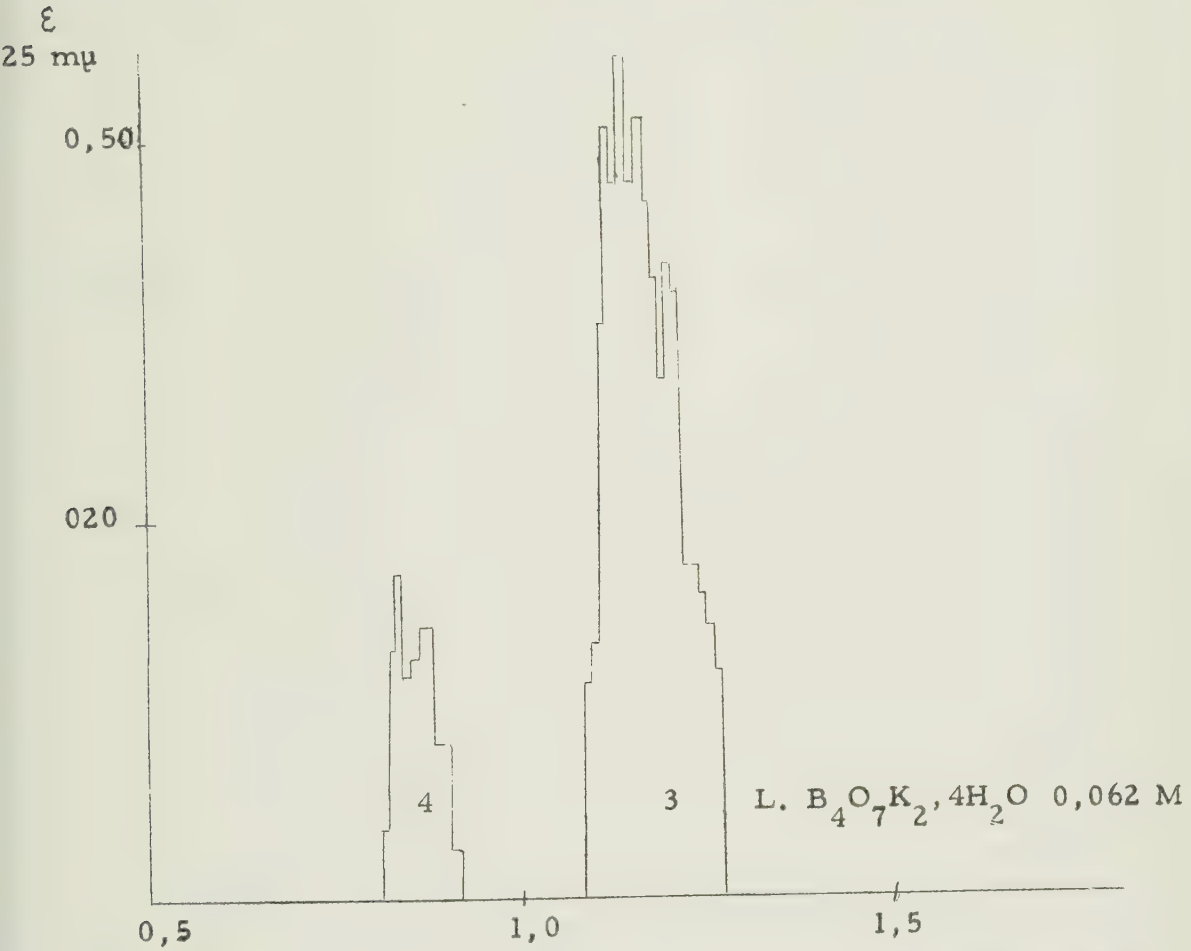
La colonne de Dowex 1 x 2 que nous avons employée avait 42 cm de haut et 1,6 cm de diamètre. Nous l'avons préparée comme indiqué dans le chapitre des méthodes générales. Un mélange de 8 mg. de chaque sucre a été placé au sommet. L'éluant était une solution de tétraborate de potassium 0,062 M. Nous avons recueilli des fractions de 5 ml à raison de 5 à 6 par heure et obtenu la courbe de séparation ci-dessous :



J. Identification sur colonne de résine Dowex 1 x2 des monophosphates formés pendant le traitement alcalin du méthyl-α-D-glucoside-4,6 phényl phosphate

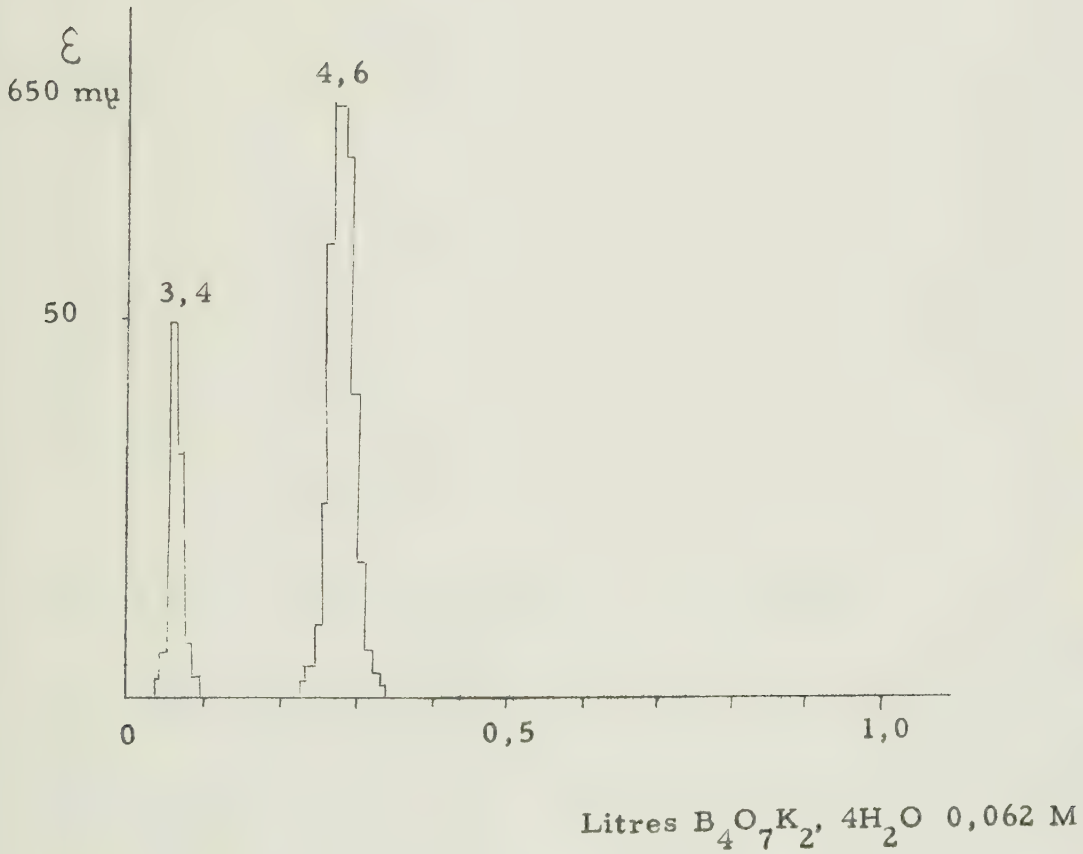
La colonne qui nous a servi est la même que celle utilisée pour la séparation précédente et nous l'avons préparée de la même

manière l'éluant était une solution de tétraborate de potassium 0,062 M. Nous avons placé 7 mmg. de mélange des monophosphates au sommet de la colonne et obtenu la courbe de séparation ci-dessous.



K. Séparation sur colonne de Dowex 1 x 2 en forme borate des méthyl-α-D-glucoside-3,4-phosphaste cyclique et méthyl-α-D-glucoside-4,6-phosphate cyclique.

Nous nous sommes servi de la même colonne que pour séparer les phényl-β-D-glucosides 4 et 6 phosphate (cf page 82) . L'éluant était une solution de tétraborate de potassium 0,062 M; Nous avons recueilli des fractions de 10 ml à raison de 2 par heure. La courbe de séparation est représentée ci-dessous:


ε
650 mμ
50
4,6
3,4
0
0,5
1,0
Litres $B_4O_7K_2$, $4H_2O$ 0,062 M

CHAPITRE IV

PREPARATION DU METHYL-α-D-GLUCOSIDE 6 PHENYL PHOSPHATE

A. 1,6-anhydre-glucopyranose à partir de l'amidon de blé en morceaux

On utilise un ballon à distiller en pyrex de 500 ml dont le tube latéral est introduit dans un ballon récepteur de façon à ce qu'un bon vide puisse être fait à l'intérieur de tout l'appareillage, dans le ballon, on place 300 g. d'amidon en morceaux et relie le ballon récepteur à une trompe à eau. Avec une grosse flamme, on chauffe fortement l'amidon et avec une autre, on empêche la mousse de se former au col. En trois quarts d'heure-une heure, tout l'amidon est carbonisé. On réunit les produits de 6 distillations et les dissout dans 300 ml d'acétone bouillant ; après une nuit de repos à température ambiante, il se dépose des cristaux brunâtres.

Rendement : 300 -350 g.

B. 2,3,4-tri-O-acétyl-1,6-anhydro-glucopyranose

120 g. de 1,6-anhydro-glucopyranose sont mis en suspension avec 120 g. d'acétate de sodium dans 480 ml d'anhydride acétique. Le tout est chauffé sur bain-marie jusqu'à dissolution complète. On chauffe 30 minutes encore, verse le mélange réactionnel dans 2,5 litres d'eau à 30° -40° et filtre à chaud sur laine de verre pour débarrasser la solution des résines formées dans la réaction. Par refroidissement, il se dépose des cristaux en fines aiguilles blanches.

Rendement : 166 g. soit 78 %

Point de fusion : 110°

C. 1,6-anhydro-2,4-di-O-benzyl-β-D-glucose

Dans un ballon à trois cols équipé d'un agitateur mécanique,

d'un réfrigérant et d'un thermomètre, on place 60 g. (0,38 mole) de 1,6-triacétyl-levoglucosane et y verse 250 ml de chlorure de benzyle et 120 ml de xylène. Au moyen d'un bain d'huile, on maintient la température intérieure du ballon à 90°. On introduit par petites portions 90g d'hydroxyde de potassium en poudre en 30 minutes environ. Pendant cette adjonction, l'agitation doit être très violente. Quand tout l'hydroxyde de potassium est ajouté, on porte la température à 105° pendant 30 minutes. Le mélange réactionnel est alors ramené à la température ambiante. On ajoute 400 ml d'eau et agite le mélange jusqu'à dissolution totale du résidu. On recueille le xylène et extrait la couche aqueuse avec 40 ml de benzène que l'on ajoute au xylène. On lave ces solvants avec de l'eau jusqu'à neutralité ; puis on chasse le xylène et le benzène par distillation à pression réduite, en portant la température à la fin de la distillation jusqu'à 100°. On dissout le résidu dans 250 ml d'alcool, ajoute 10 ml d'eau et abandonne la solution une nuit à la température ambiante. Il se dépose alors des cristaux de 1,6-anhydro-2,3,4-tri-O-benzyl-β-D-glucose que l'on recueille par filtration. Le filtrat est soumis à un entrainement à la vapeur d'eau pour éliminer les dernières traces de chlorure de benzyle. Au résidu dissous dans 100 ml d'alcool, on ajoute 10 à 20 ml d'eau. Par frottement avec un agitateur, il se forme des cristaux de 1,6-anhydro-2,4-di-O-benzyl-β-D-glucose que l'on laisse déposer plusieurs heures avant de les recueillir.

On peut aussi obtenir un produit très pur en dissolvant le résidu obtenu après l'entraînement à la vapeur dans de l'ether éthylique et en ajoutant du pentane jusqu'à un lèger trouble: la cristallisation a lieu alors immédiatement.

Rendement : 8,6 g. soit 12 %

Point de fusion : 105°

$[\alpha]_D^{20} = -28,5°$ (C = 1,7 dans le chloroforme)

D. 2,4-di-O-benzyl glucose

20 g. de dibenzyl-1,6-anhydro-glucopyranose sont dissous en chauffant doucement dans de l'anhydride acétique ; on ramène ensuite la solution à la température ambiante et ajoute 0,2 ml d'acide sulfurique concentré dissous dans 5 ml d'anhydride acétique. Le mélange réactionnel s'échauffe ; au bout de trois minutes et demie, on le verse dans de l'eau glacée. Une heure après, on décante l'eau de l'huile obtenue et rajoute de l'eau glacée. On laisse le tout reposer 15 heures. On extrait alors la substance avec 80 ml de chloroforme (30 + 30 + 20), sèche le chloroforme sur du sulfate de sodium et le chasse sous pression réduite ; on obtient une huile incolore que l'on dissout dans 300 ml de méthanol absolu auxquels on ajoute 23 ml de méthoxyde de sodium N/10. On abandonne cette solution 24 heures à la température ambiante, enlève alors l'excès d'ions sodium par de l'IR 120 en forme acide et chasse le solvant par distillation sous pression réduite. Le résidu est repris dans un peu de chloroforme et on y verse de l'éther de pétrole jusqu'à turbidité. Par refroidissement du mélange dans de la glace, se déposent de petites aiguilles blanches de 2,4 di-O-benzyl glucose.

Rendement : 14 g. soit 65 %

Point de fusion : 75° - 79°

$[\alpha]_D^{15} = +25°$ (C = 1 dans l'ethanol)

E. Méthyl-2,4-di-O-benzyl-α-D-glucoside

5 g. de 2,4-di-O-benzyl glucose sont dissous dans 125 ml de méthanol anhydre contenant 0,46 % d'acide chlorhydrique. On chauffe sous reflux pendant 24 heures. Quand la solution est refroidie, on élimine les ions chlorure avec de l'IR 45 en forme basique, concentre sous vide et recristallise le résidu dans de l'oxyde de n-butyle.

Rendement : 4 g. soit 74 %

Point de fusion : 112°

$[\alpha]_D^{20} = +45,7°$ (C = 4 dans le méthanol)

Analyse : $C_{21}H_{26}O_6$ P.M. = 374

Taux calculés	Taux trouvés
C = 67,49 %	C = 67,70 %
H = 6,96 %	H = 7,00 %

F. Hydrogénolyse du méthyl-2,4-di-benzyl-α-D-glucoside

Ce corps hydrogéné (100 mg. de substance dans 40 ml d'éthanol, 50 mg. de PdO comme catalyseur) a donné du méthyl-α-D- glucoside (Point de fusion : 165°) qui a le même Rf dans le solvant A, soit 0,14, que le méthyl-α-D-glucoside obtenu par synthèse directe.

G. Méthyl-2,4-di-benzyl-α-D-glucoside 6 phényl phosphate

On dissout dans 40 ml de pyridine anhydre, 4 g. de méthyl-di-benzyl-glucoside et on ajoute très lentement 2,8 g. de diphényl phosphorochloridate en solution dans 10 ml de pyridine anhydre. On laisse le mélange réactionnel 24 heures à la température ambiante avant d'ajouter 20 ml d'eau ; on attend alors une demi-heure et chasse la pyridine sous vide ; on dissout le résidu dans du chloroforme, lave la solution chloroformique 3 fois avec de l'acide sulfurique glacé à 1 % v/v, puis à l'eau jusqu'à neutralité. On sèche la solution sur du sulfate de sodium, chasse le solvant par distillation à pression réduite et obtient une huile.

A cette huile dissoute dans 40 ml de dioxanne, on ajoute 4,2 g. d'hydroxyde de potassium dissous dans 10 ml d'eau. On agite le tout pendant 24 heures.

On acidifie alors la solution par de l'IR 120 en forme acide et la neutralise directement par de la cyclohexylamine. On chasse le solvant par distillation sous vide et recristallise le résidu dans de l'éthanol.

Rendement : 1,8 g. soit 27 %

Point de fusion : 168°

$[\alpha]_D^{25,8°} = + 30,5°$ (C = 1 dans le méthanol)

Analyse : $C_{33}H_{44}O_9NP$ P.M. = 629

Taux calculés	Taux trouvés
C = 62,90 %	C = 62,69 %
H = 7,10 %	H = 7,16 %
N = 2,22 %	N = 2,12 %
P = 4,93 %	P = 4,31 %

Ce corps présente une bande d'absorption à 3600 cm^{-1} correspondant à la fréquence OH et révèle une seule dissociation acide par titrage potentiométrique.

H. Préparation du méthyl-α-D-glucoside 6 phényl phosphate

On hydrogène 500 mg. de la substance précédente en solution dans le méthanol avec 50 mg. d'oxyde de palladium comme catalyseur. En deux heures la quantité théorique d'hydrogène est consommée . On filtre, concentre la solution sous vide et reprend le résidu par e l'eau. On acidifie la solution par de l'IR 120 en forme acide, filtre la résine et neutralise la solution avec de l'hydroxyde de baryum avant de la concentrer à un faible volume. Le sel de baryum du méthyl-α-D-glucoside 6 (phényl phosphate) est précipité ensuite par du méthanol et recueilli par filtration.

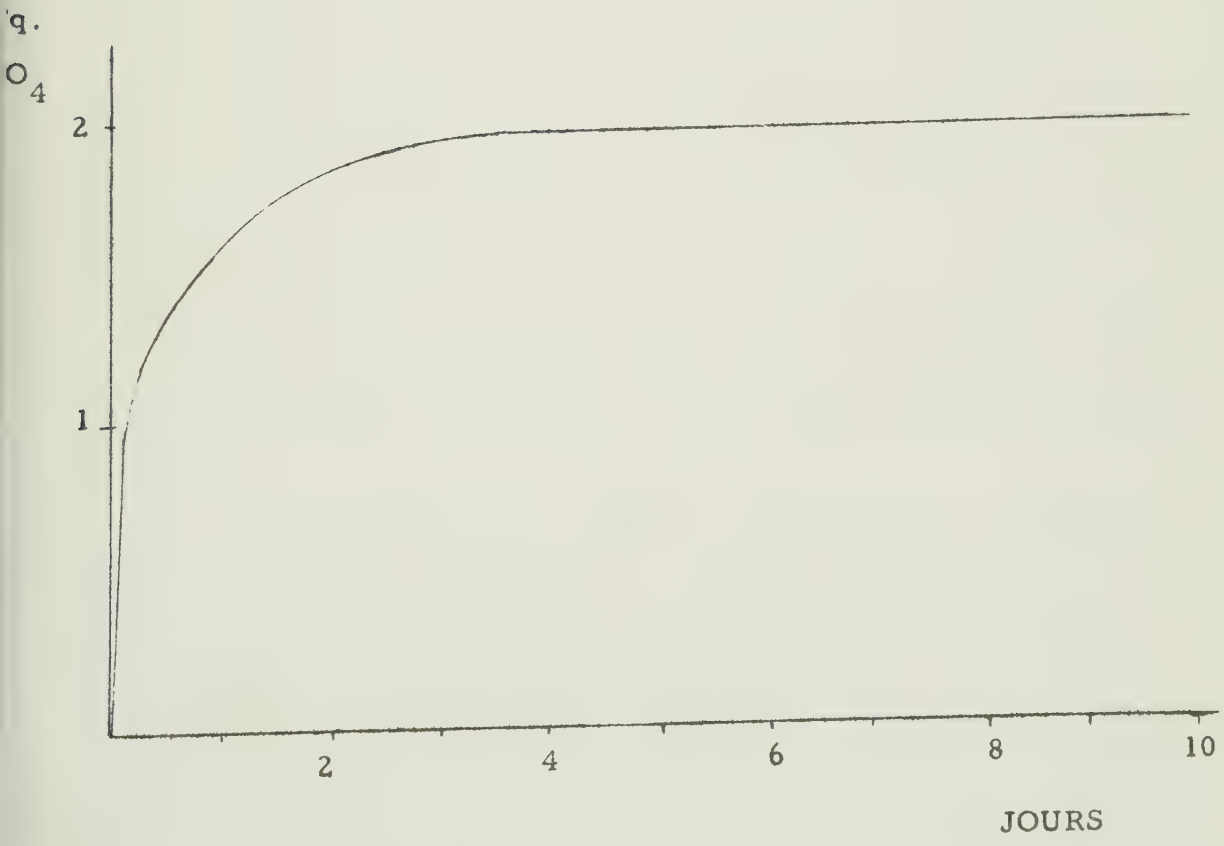
Rendement : 252 mg soit 75%

$[\alpha]_D^{25,5°} = +75°$ (C= 1 dans l'eau)

Analyse : $C_{13}H_{17}O_9P\ 0,5Ba\ 2H_2O$ P M = 453

Taux calculés	Taux trouvés
C = 34,22 %	C = 34,26 %
H = 4,65 %	H = 4,84 %
P = 6,85 %	P = 6,73 %

La consommation de périodate par le méthyl-α- D- glucoside 6 (phényl phosphate est représentée par la courbe ci-dessous.



RESUME ET CONCLUSIONS GENERALES

La migration du radical phosphoryle des mono-et diesters de l'acide phosphorique est un phénomène connu. Elle a lieu à la suite d'une cyclisation chaque fois que la molécule qu'esterifie l'acide phosphorique contient un ou plusieurs groupes hydroxyles situés dans une position stérique favorable à la formation des cycles.

Cependant on ignore le comportement des triesters de l'acide phosphorique qui sont pourtant des intermédiaires dans la synthèse des diesters.

Lors de la préparation de diesters (les méthyl- et phényl glucoside 4,6-phosphates) à partir de triesters les-4,6-(phényl phosphates) correspondants, nous avons remarqué la formation simultanée des monoesters et prouvé qu'ils ne provenait pas de l'hydrolyse alcaline du méthyl-α-D-glucoside -4,6-(phényl phosphate) et du phényl-β-D-galactoside-4,6-(phényl phosphate). Le produit principal de la réaction séparé par chromatographie des monoesters formés simultanément, a été identifié comme étant toujours le glucoside 4,6-(hydrogène phosphate).

L'analyse des mono-esters par des techniques chromatographiques et des titrages periodiques a révélé que dans les trois cas examinés ce mélange contenait une plus grande quantité de glycoside 3 - phosphate (75%) que de glycoside-4-phosphate (25%). La présence de glycoside-3-phosphate en quantité prépondérante est remarquable puisque l'hydroxyle en 3 était libre dans la molécule originale. De plus comme le glycoside-6-phosphate est absent dans le mélange des monoesters si par un changement de technique l'hydrolyse ou par la na-

ture de la molécule hydrolysée la fraction des monophosphates devenait le produit principal de la réaction, les conclusions tirées de l'examen des produits d'hydrolyse pour établir la structure originale de la molécule risqueraient d'être fausses. Si les observations de COLLINS, selon lesquelles des triesters de l'acide phosphorique existeraient dans des produits naturels se trouveraient confirmées, ces résultats pourraient avoir un certain intérêt biochimique.

Pour établir la structure des monophosphates formés pendant cette transestérification tous les monophosphates des phényl-β-D-glucopyranoside et galacto pyranoside, à savoir les 2,3,4 et 6-phosphates ont été synthétisés.

Nous avons trouvé que l'oxychlorure de phosphore, dont l'emploi avait été plus ou moins abandonné tant il est difficile de purifier le produit phosphorylé, est le meilleur agent phosphorylant dans la sythèse des monoesters de l'acide phosphorique, chaque fois que le support glucidique peut être rendu hydrophobe par un choix judicieux des groupes protecteurs des hydroxyles.

En préparant les intermédiaires pour la synthèse de certains monophosphates, nous avons pu démontrer que les réactivités des différents hydroxyles des glycosides varient suivant la nature du groupe aglycone. Ainsi, sur le méthyl 4,6-benzylidène -D-glucoside, l'attaque du chlorure de benzoyle se fait de préférence sur l'hydroxyle en 2, mais c'est sur celui en 3 qu'elle a lieu dans le cas des phényl 4,6-benzylidène βD-glucoside et -galactoside.

Pour les synthèses des phényl glucoside- et galactoside-3- phosphates, malgré de nombreux essais, nous ne sommes pas parvenu à obtenir un dérivé des phényl glycosides dont seule la fonction hydroxyle en 3 restât libre. Nous avons donc préparé les 4,6-benzylidène phényl glycoside 2,3-(phénylphosphates) : leur hydrolyse donnait

un mélange de phényl glycoside-2 et 3-phosphates dont le 3-phosphate, prédominant, fut isolé. Cette suite de réactions confirmait nos résultats antérieurs sur la réactivité plus grande du groupe hydroxyle en 3 des phényl gluco- et galactopyranosides.

Le groupe aglycone des glycosides phosphorylés n'a pas d'influence sur la composition de la fraction des monophosphates formés par transesterification lors de l'hydrolyse des 4,6(phényl phosphates) des glycosides; en revanche, il modifie les proportions relatives des 4- et6-phosphates obtenus par l'hydrolyse des 4,6-(hydrogène phosphate). Ainsi, après l'hydrolyse alcaline des méthyl-α-D-glucoside- et méthyl-β-L-galactoside-4,6-phosphates cycliques, on retrouve 4 à 5 fois plus des méthyl glycoside 4- phosphates que des méthyl glycoside 6-phosphates, tandis que le même traitement des phényl-β-D-glucoside- et-galactoside-4,6-phosphates cycliques ne donne que 2 à 3 fois plus de glycoside4-phosphate que de glycoside 6-phosphate.

Nous avons identifié les différents monophosphates formés sur résine échangeuse d'ions après avoir étalonné les colonnes avec les monophosphates authentiques des glycosides. Pendant cette analyse, nous avons observé que le groupe aglycone des glycosides avait une grande influence sur l'acidité des phosphates de sucre. Les phosphates des phényl glycosides sont des acides plus forts que ceux des méthyl glycosides et cette différence est accrue par les complexes que forment les sucres avec l'ion borate.

Nous avons vainement tenté d'élaborer une synthèse du méthyl-α-D- glucoside-3,6phosphate, que nous avons considéré tout d'abord comme un intermédiaire possible pendant l'hydrolyse alcaline du méthyl-α-D-glucoside4,6-(phénylphosphate. Ce composé contiendrait un cycle phosphorylé à sept chaînons, bâti sur le noyau pyranoïde de

l'hexose. Or sur des modèles moléculaires les tensions à exercer sur la molécule pour former ce cycle sont très fortes, ce qui rend peu problable sa formation et explique nos résultats négatifs.

Pour ces expériences nous avons synthétisé le méthyl 2, 4 di-O-benzyl-α-D-glucopyranoside et nous avons essayé de le phosphoryler soit avec le dichlorophényl phosphate ou par réaction sur le sucre du diphénylchlorophosphate suivie d'un traitement alcalin. Dans les deux cas, le seul produit que nous pu isoler était le méthyl 2,4-di-O-benzyl-α-D-glucoside 6-(phénylphosphate).

Ceci nous a permis de démontrer que l'hydrolyse du phényle des phényl-phosphates de glucide ne peut s'opérer que si les 2 autres fonction de l'acide phosphorique sont estérifiées: les diphénylphosphatesde glucide se transforment en diesters de l'acide phosphorique cyclisés sur la molécule du sucre, si la cyclisation n'est pas possible seul un des deux groupes phényles est éliminé.

BIBLIOGRAPHIE

1 - O. BAILLY et J. GAUMÉ, Bull. Soc. Chim. France, 2, 354, (1935)

2 - M.C. BAILLY, C.R. Acad. Sciences, 206, 1902, (1938)

3 - P.E. VERKADE, J.C. STOPPELENBURG et W.D. COHEN, Rec. Trav. Chim. Pays-Bas, 59, 886, (1940)

4 - E. CHARGAFF, J. Biol. Chem., 144, 455, (1942)

5 - E. BAER et M. KATES, J. Biol. Chem., 175, 79, (1948)

6 - E. BAER et M. KATES, J. Amer. Chem. Soc., 70, 1934, (1948)

7 - A. FONÓ, Archiv. Kemi. Minerval. Geol., 24, A, 3415, (1947)

8 - C.E. CARTER et W.E. COHN, Fed. Proc, 8, 190, (1949)

9 - W.E. COHN, J. Amer. Chem. Soc., 71, 2275, (1949)

10 - W.E. COHN, J. Amer. Chem. Soc., 72, 1471, (1950)

11 - D. LIPKIN et G.G. Mc. ELNEHY, J. Amer. Chem. Soc., 72, 2287, (1950)

12 - N.G. LUTHY et H.S. LORING, H.W. BORTNER, L.W. LEVY, J. Amer. Chem. Soc., 72, 2811, (1950)

13 - W.E. COHN, J. Amer. Chem. Soc., 72, 2811, (1950)

14 - C.E. CARTER, J. Amer. Chem. Soc., 72, 1466, (1950)

15 - D.M. BROWN et A.R. TODD, J. Chem. Soc., 44, (1952)

16 - D.M. BROWN et A.R. TODD, J. Chem. Soc., 52, (1952)

17 - H. STEUDEL et E. PEISER, Z. Physiol. Chem., 120, 292, (1922)

18 - P.A. LEVENE, J. Biol. Chem., 40, 415, (1919)

19 - P.A. LEVENE, J. Biol. Chem., 55, 9, (1923)

20 - W. JONES et M. E. PERKINS, J. Biol. Chem., 62, 557, (1925)

21 - H.O. CALVERY, J. Biol. Chem., 72, 27, (1927)

22 - H.S. LORING, P.M. ROLL et J.G. PIERCE, J. Biol. Chem., 174, 729, (1948)

23 - D.M. BROWN, D.I. MAGRATH et A. R. TODD, J. Chem. Soc. 2708, (1952)

24 - R. MARKHAM et J.D. SMITH Nature, 168, 406, (1951)

25 - R. MARKHAM et J.D. SMITH , Biochem. J., 52, 552, (1952)

26 - D. LIPKIN, P.T. TALBERT et M. COHN, J. Amer. Chem.Soc., 76, 2871, (1954)

27 - D. LIPKIN, et J.L. DIXON, Science, 116, 525, (1952)

28 - E. BLUMENTHAL et J.B.M. HERBERT, Trans. Faraday Soc., 41, 611, (1945)

29 - D.O. JORDAN, Ann. Rev. Biochem., 21, 209, (1952)

30 - C.A. DEKKER et H.G. KHORANA, J. Amer. Chem. Soc. , 76, 3522, (1954)

31 - J.BADDILEY, J. G. BUCHANAN et L. SZABÓ, J. Chem. Soc., 3826, (1954)

32 - P.A. LEVENE et A.L. RAYMOND, J. Biol. Chem. , 102, 347, (1933) 107, 75, (1934)

33 - J.G. MOFFATT et H.G. KHORANA , J. Amer. Chem. Soc.,79, 1194, (1957)

34 - H. G. KHORANA, G.M. TENER, R.S. WRIGTH et J. G. MOFFAT. J. Amer. Chem. Soc. , 79, 430, (1957)

35 - P. SZABÓ et L. SZABÓ, J. Chem. Soc. , 448, (1961)

36 - P. SZABÓ et L. SZABÓ, J. Chem. Soc., 3758, (1960)

37 - J. BADDILEY et E. M. THAIN, J. Chem. Soc. 3421, (1951)

38 - M.C. BAILLY, Bull. Soc. Chim. France , 9, 340, (1942)

39 - A. DESJOBERT, Bull. Soc. Chim. France, 14, 809, (1947)

40 - W.W. BUTCHER et F.H. WESTHEIMER, J. Amer. Chem. Soc., 77, 2420, (1955)

41 - C.A. VERNON, Phosphoric esters and related Compounds., 30, (1957)

42- P.W.C. BARNARD, C.A. BUNTON, D.R. LLEWELLYN, K.G. OLDHAM, B.L. SILVER et C.A. VERNON, Chem. and Ind., 760, (1955)

43 - C.A. BUNTON, T.A. LEWIS, D.R. LLEWELLYN, et C.A. VERNON, J. Chem. Soc., 4419, (1955)

44 - P.C. HAAK et F.H. WESTHEIMER, J. Amer. Chem. Soc., 83, 1102, (1961)

45 - O. BAILLY, Bull. Soc. Chim. France, 31, 848, (1922)

46 - T. UKITA, N.A. BATES et H.E. CARTER, J. Biol. Chem., 216 867, (1955)

47 - J. LECOCQ, C.R. Acad. Sci., 242, 1902, (1956)

48 - J. KUMAMOTO, J.R. COX, Jr et F.H. WESTHEIMER, J. Amer, Chem. Soc., 78, 4858, (1956)

49 - J.R. COX, Jr. R.E. WALL et F.H. WESTHEIMER, Chem. and Ind., 929, (1959)

50 - F.D. COLLINS, Nature, 188, 297, (1960)

51 - M.C. BAILLY, C.R. Acad. Sci., 208, 444, (1939)

52 - R. ROBISON et W.T. MORGAN, Biochem. J., 22, 1270, (1928)

53 - B. TANKO et R. ROBISON, Biochem. J. 29, 961, (1935)

54 - D. LIPKIN et P.T. TALBERT, Chem. and Ind., 143, (1955)

55 - G. ZEMPLEN, Z. CZÜROS, et S.J. ANGYAL, Ber., 70, 1854, (1937)

56 - C. NEUBERG et H. POLLAK, Ber., 43, 2060, (1910)

57 - E. BAER, Biochem. Preparations, 2, 25, (1952)

58 - F.R. ATHERTON, H.T. OPENSHAW et A.R. TODD, J. Chem. Soc., 382, (1945)

59 - E. FISCHER, Ber., 47, 3193, (1914)

60 - E.M. MONTGOMERY, N.K. RICHTMEYER et C.S. HUDSON, J. Amer. Chem. Soc., 64, 690, (1942)

61 - B. HELFERICH, Ber., 77, 194, (1944)

62 - G. ZEMPLEN et A. KUNZ, Ber. ,56, 1705, (1923)

63 - D.H. LEABACK, J. Chem. Soc., 3166, (1960)

64 - M. MAC CLOSKEY et G.H. COLEMAN, J. Org. Chem. ,10 184, (1945)

65 - K. FREUDENBERG, H. TOEPFFER et C. ANDERSEN, Ber., 61, 1750, (1928)

66 - R.W. JEANLOZ et D.A. JEANLOZ, J. Amer. Chem. Soc., 79, 2579,(1957)

67 - J. HONEYMANN et J.W. MORGAN, J. Chem. Soc. 3660,(1955)

68 - P. FLEURY, J. LECOCQ et L. LE DIZET, C.R. Acad. Sci., 242, 420, (1956)

69 - K. DIMROTH, H. WITZELL, W. HÜLSEN et H. MIRBACH, Ann., 620, 94, (1959)

70 - F.J. REITHEL et C.K. CLAYCOMB, J. Amer. Chem. Soc., 71, 3669, (1949)

71 - E. ERWIG et K.W. KOENIGS , Ber. , 22, 2207, (1889)

72 - C.S. HUDSON, J. Amer. Chem. Soc. , 37, 1591, (1915)

73 - J. BADDILEY et E. M. THAIN, J. Chem. Soc. , 903, (1953)

74 - H.S. FOREST et A.R. TODD, J. Chem. Soc. , 3295, (1950)

75 - H. S. MOSHER , J. REINHART, H.C. PROSSER, J. Amer.Chem. Soc. , 75, 4899, (1953)

76 - T. UKITA, K. NAGASAWA, M. IRIE, Pharmaceutical. Bull. (Japan) 5, 121, (1957)

77 - T. UKITA, K. NAGASAWA, M. IRIE, Pharmaceutical. Bull. (Japan) 5, 128, (1957)

78 - J. C. DENNYSON, et B.I. MAC GILVRAIN, J. Chem. Soc., 1616, (1951)

79 - G.W. KENNER, Fortschr. Chem. Org. Naturstoffe, 8, 96, (1951)

80 - K. ZEILE et W. KRUCKENBERG, Ber., 75, 1127, (1942)

81 - G. ZEMPLEN et A. GERECS, Ber. , 64B, 1545, (1931)

82 - SYNTHESES ORGANIQUES, page 348

83- St LEWAK, Thèse (Paris) 1960

84- J.X. KHYM et W.E. COHN, J. Amer. Chem. Soc. , 75, 1153, (1953)

85 - C.S. HANES et F.A. ISHERWOOD , Nature, 164, 1107, (1949)

86 - M. VISCONTINI, D. HOCH et P. KARRER, Helv. Chem. Acta., 38, 642, (1955)

87 - S.M. PARTRIDGE, Nature, 164, 443, (1949)

TABLE DES MATIERES.

Pages

INTRODUCTION 1

PREMIERE PARTIE

CHAPITRE I. - ESTERS PHOSPHORIQUES DU PHENYL-β-D-GLUCOSIDE 10

1) Préparation du phényl-β-D-glucoside 4,6-phosphate cyclique 14

2) Synthèse du phényl-β-D-glucoside-2 phosphate 20

3) Synthèse du phényl-β-D-glucoside-3-phosphate 26

4) Synthèse des phényl-β-D-glucosides-4 et6 phosphate. 30

CHAPITRE II.- ESTERS PHOSPHORIQUES DU PHENYL-β-D-GALACTOSIDE 33

1) Synthèse du phényl-β-D-galactoside-4,6-phosphate cyclique 35

2) Synthèse du phényl-β-D- galactoside-2-phosphate... 39

3) Synthèse du phényl-β-D-galactoside-3-phosphate 42

4) Synthèse des phényl-β-D-galactosides-4 et -6-phosphate 45

Pages

CHAPITRE III. COMPORTEMENT DU METHYL-α-D-GLUCOSIDE 4,6-(PHENYL PHOSPHATE) EN MILEU ALCALIN ... 47

CHAPITRE IV. SYNTHESE ET PREUVE DE LA STRUCTURE DU METHYL-α-D-GLUCOSIDE 6(PHENYL PHOSPHATE) .. 50

CHAPITRE V. IDENTIFICATION DES PHOSPHATES DES GLYCOSIDES SUR COLONNES D'ECHANGEUSES D'IONS 58

DEUXIEME PARTIE PARTIE EXPERIMENTALE

CHAPITRE I. METHODES GENERALES 62

CHAPITRE II. SYNTHESES DES PHOSPHATES DU PHENYL-β-D-GLUCOSIDE 69

CHAPITRE III. SYNTHESES DES PHOSPHATES DU PHENYL-β-D-GALACTOSIDE 97

CHAPITRE IV. PREPARATION DU METHYL-β-D-GLUCOSIDE-4,6-PHENYL PHOSPHATE.....118

CHAPITRE V.PREPARATION DU METHYL-β-D-GLUCOSIDE-6-PHENYL PHOSPHATE 127

RESUME ET CONCLUSIONS GENERALES 133

BIBLIOGRAPHIE 137

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Mode d'action de l'amino-oxydase.

Vu et approuvé :

Paris, le 28 Février 1962
Le Doyen de la Faculté des Sciences,
Marc ZAMANSKI

VU
et Permis d'imprimer :
Le Recteur de l'Académie de Paris,
Jean ROCHE